

**Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
BIOCHIMICA**

Ciclo XXI

Settore scientifico disciplinare di afferenza: BIO/10

**ALIMENTI FUNZIONALI E COMPONENTI  
NUTRACEUTICI COME BIOMODULATORI**

Tesi di Dottorato

Presentata da: Emanuela Leoncini

Coordinatore Dottorato

Chiar.mo Prof. Giorgio Lenaz

---

Relatore

Chiar.ma Prof.ssa Silvana Hrelia

---

Esame finale anno 2009



## INDICE

<b>1</b>	<b>Alimenti funzionali</b>	<b>1</b>
1.1	Dalla Alimentazione “adeguata” alla Alimentazione “funzionale”	1
1.2	Definizione di alimenti funzionali	3
1.3	Alimenti funzionali: European Consensus document	5
1.4	Health Claims	8
<b>2</b>	<b>I glucosinolati e il sulforafane</b>	<b>13</b>
2.1	Un esempio di componente funzionale: i Glucosinolati	13
2.2	Struttura chimica e proprietà	14
2.3	Idrolisi	15
2.4	Liberazione, assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione dei glucosinolati e dei loro prodotti di idrolisi	16
2.4.1	Liberazione e assorbimento	18
2.4.2	Distribuzione	21
2.4.3	Metabolismo ed escrezione	23
2.5	Valutazione sperimentale dell’uptake di ITC nell’uomo in seguito ad esposizione dietetica	25
2.6	Biodisponibilità dei prodotti di idrolisi dei glucosinolati nella dieta umana	27
2.7	Stima dell’assunzione dei glucosinolati nella dieta umana	29
<b>3</b>	<b>Sistema antiossidante endogeno</b>	<b>31</b>
3.1	Le principali difese antiossidanti endogene	31
3.2	Antiossidanti primari: enzimi protettivi	32
3.2.1	Superossido dismutasi	32
3.2.2	Catalasi	35
3.3	Glutathione ed enzimi ad esso correlati	35

3.4	Enzimi detossificanti di fase 2	39
3.4.1	La tioredoxina reduttasi 1	39
3.4.2	La NADP(H): chinone ossidoreduttasi 1	41
3.4.3	Detossificazione dei chinoni attraverso la riduzione a due elettroni	42
3.4.4	NQO1 come enzima antiossidante: ruolo nel metabolismo dell'ubichinone e della vitamina E	42
<b>4</b>	<b>La via di segnalazione Nrf2-ARE</b>	<b>45</b>
4.1	Induzione degli enzimi citoprotettivi	45
4.1.1	Antioxidant Responsive Element (ARE) e ARE induttori	47
4.1.2	La via di segnalazione ARE-mediata e i meccanismi di difesa: ruolo della proteina Nrf2	50
4.1.3	Regolazione della attività trascrizionale di ARE: il sistema Nrf2-Keap1	53
4.1.4	Ruolo del sulforafane nella via mediata da Keap1-Nrf2	56
4.1.5	Induzione degli enzimi di fase 2 mediata dal sulforafane	59
<b>5</b>	<b>Scopo della tesi</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>Materiali e Metodi</b>	<b>67</b>
6.1	Preparazione delle colture cellulari di cardiomiociti neonatali (Yagev et al., 1984)	67
6.2	Supplementazione con sulforafane	70
6.3	Determinazione delle attività enzimatiche	70
6.3.1	Valutazione dell'attività dell'enzima glutatione-S-transferasi (GST)	70
6.3.2	Valutazione dell'attività dell'enzima glutatione reduttasi (GR)	71
6.3.3	Valutazione dell'attività dell'enzima glutatione perossidasi (GPx)	73
6.3.4	Valutazione dell'attività dell'enzima superossido dismutasi (SOD)	74
6.3.5	Valutazione dell'attività dell'enzima catalasi (CAT)	76
6.3.6	Valutazione dell'attività dell'enzima tioredoxina reduttasi (TR)	78
6.3.7	Valutazione dell'attività dell'enzima NADPH chinone reduttasi (NQO1)	80
6.4	Valutazione dei livelli intracellulari di glutatione ridotto (GSH)	81
6.5	Valutazione della formazione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS)	82

6.6	Analisi della vitalità cellulare _____	83
6.7	Tecniche di Immunoblotting _____	84
6.8	Analisi RT-PCR per lo studio dell'espressione genica _____	86
6.9	Estrazione nucleare _____	87
6.10	Localizzazione nucleare del fattore di trascrizione Nrf2 _____	88
<b>7</b>	<b>Risultati _____</b>	<b>91</b>
7.1	Effetto citoprotettivo del sulforafane in cellule cardiache in coltura _____	91
7.2	Meccanismo antiossidante indiretto del sulforafane _____	93
7.3	Effetto del sulforafane sull'espressione ed attività degli enzimi di fase 2 ____	95
7.3.1	Glutathione-S-Transferasi _____	95
7.3.2	Glutathione Reduttasi _____	97
7.3.3	Glutathione perossidasi _____	97
7.3.4	NAD(P)H: chinone ossidoreduttasi 1 _____	97
7.3.5	Tioredoxina reduttasi _____	101
7.3.6	Attività della superossido dismutasi (SOD) _____	103
7.3.7	Attività della catalasi (CAT) _____	104
7.3.8	Contenuto intracellulare di Glutathione ridotto (GSH) _____	105
7.4	Effetto del sulforafane sulla traslocazione nucleare di Nrf2 _____	106
7.5	Effetto del sulforafane sull'espressione genica degli enzimi detossificanti di fase 2 _____	109
7.6	Effetto del sulforafane sull'espressione genica di Nrf2 _____	112
7.7	Effetto del sulforafane su MAPKs e PI3K/Akt. _____	113
7.8	Coinvolgimento delle vie di trasduzione del segnale MAPKs e PI3K/Akt nella modulazione dell'espressione genica mediata da SF _____	115
<b>8</b>	<b>Discussione _____</b>	<b>117</b>
<b>9</b>	<b>Bibliografia _____</b>	<b>129</b>
<b>10</b>	<b>Pubblicazioni a stampa _____</b>	<b>153</b>
<b>11</b>	<b>Comunicazioni a congressi _____</b>	<b>155</b>



---

## ***1 ALIMENTI FUNZIONALI***

---

### **1.1 DALLA ALIMENTAZIONE “ADEGUATA” ALLA ALIMENTAZIONE “FUNZIONALE”**

Per comprendere cosa siano e cosa rappresentino gli alimenti funzionali è necessario innanzitutto esaminare i cambiamenti che hanno segnato l'evoluzione della moderna scienza della nutrizione. Il ruolo della nutrizione è progredito dai concetti classici, consistenti nella prevenzione di patologie carenziali e nell'adequatezza dell'alimentazione di base, alla promozione di uno stato di benessere e salute e di riduzione del rischio di malattia, passando così al concetto di alimentazione "positiva" od "ottimale".

Nel corso del XX secolo la nutrizione ha individuato i nutrienti essenziali ed ha stabilito gli standard e le linee guida nutrizionali. Più di recente sono anche state fatte raccomandazioni rivolte ad evitare un consumo eccessivo di questi nutrienti, dopo aver riconosciuto il loro potenziale ruolo nell'eziologia di diverse malattie in particolare quelle cronico-degenerative. Come risultato di queste acquisizioni, uno dei contributi principali della nutrizione è stato la formulazione del concetto di dieta bilanciata, “una appropriata combinazione di alimenti che fornisca il fabbisogno minimo di nutrienti e altri componenti necessari per sostenere la crescita ed il mantenimento dell'organismo, per prevenire lo sviluppo di deficienze e per ridurre il rischio di malattie associate ad eccessi dannosi”(James, 1988).

Il XXI secolo, invece, presenta nuove esigenze: da una parte la necessità del contenimento dei costi della spesa sanitaria legati all'aumento della vita media, alle mutazioni ambientali e dello stile di vita e ad un conseguente aumento delle patologie cronico-degenerative, dall'altra la richiesta di un miglioramento della qualità della vita e dell'invecchiamento.

Negli ultimi decenni infatti, la richiesta dei consumatori nel campo della produzione alimentare è cambiata considerevolmente. I consumatori sono sempre più interessati ai potenziali benefici degli alimenti e sempre di più credono che il cibo possa contribuire direttamente alla loro salute (*Mollet et al., 2002*).

Una recente indagine condotta nel Regno Unito, in Francia ed in Germania ha portato alla conclusione che i consumatori ritengono che la dieta sia addirittura più importante dell'esercizio fisico o dei fattori ereditari nel mantenere un buono stato di salute (*Hardy, 2000*).

Le recenti acquisizioni in campo scientifico inoltre, supportano l'ipotesi che la dieta, oltre ad essere nutriente e gradevole, possa rappresentare una prima linea di difesa e modulare varie funzioni dell'organismo ed essere quindi considerata "funzionale".

In questo contesto, quindi, gli alimenti funzionali rappresentano il punto d'incontro tra ricerca scientifica, innovazione tecnologica e domanda di benessere.

Il concetto di alimenti funzionali, tuttavia, non è totalmente nuovo. Nelle zone asiatiche, influenzate dalla cultura cinese, gli alimenti e i farmaci sono spesso stati considerati derivanti da un'unica fonte (*Kojima, 1996*). Nel vecchio libro della medicina cinese "Shinongbochokyung" venivano consigliati ad uso terapeutico ben 365 tipi di differenti piante, animali e minerali. Questi venivano classificati in tre gruppi: "Classe alta" contenente medicinali adatti alla cura delle patologie croniche, "Classe media" e "Classe bassa" comprendenti farmaci utilizzati per la cura delle malattie acute a causa della loro forte tossicità (*Hue et al., 1997*). I medicinali appartenenti alla "Classe alta" includevano anche alimenti convenzionali come riso, grano, sesamo, zenzero e porri. Questo a conferma che la dieta di base veniva considerata una delle parti principali nella prevenzione e nel trattamento delle malattie croniche. Proprio partendo da questo concetto, molti alimenti convenzionali sono oggi considerati alimenti "salutari" in Corea, Giappone e Cina.



## 1.2 DEFINIZIONE DI ALIMENTI FUNZIONALI

Il termine “alimento funzionale”, così come il concetto stesso, sono stati proposti per la prima volta in Giappone nei primi anni '80 quando, con il supporto del Ministero dell'Educazione, Scienza e Cultura (MESC), i progetti nazionali “Systematic analysis and development of food functionalities (1984-1987) e “Analysis of body-modulating functions of food (1988-1991) cominciarono ad essere sviluppati (*Arai, 1996*).

Durante questi anni si iniziarono seriamente a comprendere i potenziali problemi che sarebbero potuti nascere con il rapido invecchiamento della popolazione e così si iniziò a prendere in considerazione l'idea di poter prevenire le malattie legate all'invecchiamento attraverso un corretto stile alimentare. Diversi studi che avevano preso in considerazione il ruolo degli alimenti nella prevenzione delle malattie avevano dimostrato che “ci sono una varietà di sostanze che derivano dagli alimenti con funzioni terziarie che si può supporre siano coinvolte nella prevenzione delle malattie modulando il sistema immunitario, endocrino, nervoso, circolatorio e digestivo”. Se l'apporto di nutrienti definisce la “funzione primaria” e la soddisfazione sensoriale, che indirizza le scelte dei consumatori, viene considerata la “funzione secondaria” degli alimenti, la valenza salutistica rappresenta la definizione di “funzione terziaria” che gli alimenti funzionali cercano di sviluppare.

Nel 1988 Il Ministero giapponese della salute e del Welfare (MHW) organizzò un meeting sugli alimenti funzionali allo scopo di decidere come regolamentare questi alimenti (*Hue et al., 1997*). Nel report prodotto da questo incontro gli alimenti funzionali sono definiti come alimenti creati e processati in modo da esprimerne le funzioni relazionabili ai meccanismi di difesa dell'organismo e alla prevenzione e cura delle malattie (*Anon, 1994*). Devono inoltre essere soddisfatte le seguenti condizioni:

- essere formati da ingredienti o composizioni di ingredienti convenzionali ed essere consumati come vengono convenzionalmente consumati gli alimenti;
- essere consumati come parte della dieta base;
- essere etichettati come aventi funzioni di controllo dell'organismo.

Va enfatizzato come questo ruolo di alimento incorpora funzioni che precedentemente erano attribuite solo ai farmaci, sebbene, come alimenti, debbano essere assunti nel contesto della dieta quotidiana.

Nel 1991 il Ministero della Salute e del Welfare stabilì i criteri per l'identificazione e approvazione di una specifica categoria di alimenti, chiamata FOSHU (FOod for Specified Health Uses) e ne regolamentò anche l'etichettatura nutrizionale permettendo che fossero successivamente commercializzati con questo marchio. Questi alimenti rappresentano una delle quattro categorie di alimenti indicate come "alimenti per usi dietetici speciali" cioè alimenti che sono utilizzati per migliorare la salute, ognuno dei quali può "vantare" un claim specifico e dove l'etichettatura suggerisce che le persone che li assumono possono raggiungere il benefico effetto salutistico voluto (*Anon, 1991*).

In aggiunta dovevano essere soddisfatti i seguenti requisiti:

- l'alimento deve contribuire al miglioramento della dieta di ciascuno ed al mantenimento/rafforzamento della salute;
- i benefici salutistici dell'alimento o dei suoi costituenti devono avere una chiara base medica e nutrizionale;
- sulla base delle conoscenze mediche o nutrizionali, deve essere possibile poter definire un apporto giornaliero dell'alimento o dei suoi costituenti;
- sulla base dell'esperienza, l'alimento o i suoi costituenti devono essere sicuri per l'alimentazione;
- i costituenti dell'alimento devono essere ben definiti in termini di proprietà chimico-fisiche e determinazione analitica qualitativa-quantitativa;

- non devono esserci significative perdite di costituenti nutritivi dell'alimento rispetto a quelli contenuti in alimenti simili;
- l'alimento deve appartenere ad una tipologia quotidianamente consumata nella dieta, piuttosto che assunto occasionalmente;
- il prodotto deve essere in forma di alimento e non in altre forme come pillole o capsule;
- l'alimento e i suoi costituenti non devono essere quelli utilizzati esclusivamente come farmaci.

Non c'è dubbio che l'interesse giapponese per gli alimenti funzionali abbia aumentato la consapevolezza della necessità di questo tipo di prodotti anche in Europa e negli Stati Uniti. La ricerca scientifica applicata a questo specifico campo nutrizionale indicava prospettive molto promettenti rappresentando non solo un beneficio per la salute dei consumatori ma anche un valore aggiunto ai prodotti alimentari che poteva rappresentare un potenziale commerciale per le industrie.

La cultura orientale ed occidentale, tuttavia, divergono considerevolmente riguardo la natura degli alimenti funzionali. In Giappone, per esempio, gli alimenti funzionali tradizionali sono considerati come una categoria separata di alimenti, il che significa che, dopo l'approvazione, il simbolo FOSHU può essere esposto sull'etichetta. Per questi prodotti, spesso indicati come alimenti funzionali di prima generazione, la "funzionalità" è di primaria importanza rispetto al gusto. In Europa e USA invece, parlare di alimento funzionale significa aggiungere funzionalità ad un prodotto tradizionale già esistente (spesso un prodotto di largo consumo) e questo tipo di prodotto non costituisce una categoria separata di alimenti.

### **1.3 ALIMENTI FUNZIONALI: EUROPEAN CONSENSUS DOCUMENT**

Dopo la sua nascita in Giappone, si è assistito ad una evoluzione del concetto di "alimento funzionale" a livello internazionale tanto che

oggi tale concetto varia a livello di singolo Paese. Ciò rispecchia le differenze di tipo culturale, di approccio alla scienza della nutrizione e la diversa situazione dei mercati.

Nel 1995 l'International Life Sciences Institute (ILSI) organizzò la prima Conferenza Internazionale "*East-West Perspectives on Functional Foods*". Nell'incontro, gli alimenti funzionali furono definiti come alimenti che migliorano o influenzano le funzioni dell'organismo al di là ed oltre i loro valori nutrizionali comuni (Anon, 1996). Questa può essere considerata la prima definizione concordata a livello internazionale. La conferenza stabilì inoltre che:

- gli alimenti funzionali dovrebbero essere distinti dalle vitamine, i minerali ed altri integratori dietetici;
- questi alimenti non dovrebbero essere inclusi in indicazioni mediche;
- gli effetti funzionali degli alimenti devono essere scientificamente provati per mezzo di studi "*in vitro*" ed "*in vivo*".

L'approccio adottato in questo meeting fu ampiamente in accordo con quello adottato in Giappone.

E' in questo contesto generale che nel 1996, sotto il coordinamento dell'ILSI Europe, l'Unione Europea ha realizzato una Azione Concertata della Commissione Europea sulla Functional Food Science in Europa (FUFOSE) allo scopo di stabilire e sviluppare un approccio scientificamente fondato sulle evidenze richieste a sostegno dello sviluppo di prodotti alimentari che si possono definire Alimenti Funzionali.

Il documento finale è stato pubblicato sul British Journal of Nutrition nel 1999 (Diplock et al., 1999)

Dal momento che gli alimenti funzionali rappresentano un concetto più che una specifica e definita categoria di alimenti, questo consensus document propone una definizione di lavoro:

"un alimento può essere considerato funzionale se viene dimostrato in modo soddisfacente che sia in grado di influenzare in modo benefico

una o più funzioni target dell'organismo, al di là del suo puro valore nutrizionale, in un modo che sia rilevante sia per il miglioramento dello stato di salute e di benessere e/o per la riduzione del rischio di malattia. Un alimento funzionale rimane un alimento e deve dimostrare il suo effetto in quantità che sono normalmente consumate nell'ambito di una dieta normale: non è una pillola o una capsula, ma parte di un normale regime alimentare" (*Diplock et al., 1999*).

I principali aspetti di questa definizione sono:

- la natura degli alimenti funzionali - non pillole, capsule o nessuna forma di integratori, ma alimenti convenzionali
- la dimostrazione scientifica degli effetti e quindi fondatezza scientifica della valenza salutistica che rivendicano
- l'effetto benefico su una funzione corporea, oltre all'effetto nutrizionale, rilevante per un miglioramento dello stato di salute e benessere inclusa la performance fisica e psicologica e la riduzione del rischio (non prevenzione) di malattia
- il consumo come parte di un normale regime alimentare

Da un punto di vista pratico un alimento funzionale può essere sia un alimento naturale sia essere reso funzionale mediante l'applicazione di mezzi tecnologici o biotecnologici per aumentare la concentrazione, aggiungere, rimuovere o modificare un componente particolare o aumentarne la biodisponibilità, provato che questo componente abbia un effetto funzionale, come descritto nella definizione.

Per attribuire specifiche proprietà salutistiche e/o fisiologiche ad alimenti o a loro componenti è necessario seguire un iter scientifico rigoroso. La strategia proposta da Roberfroid si basa su 3 livelli sequenziali (*Roberfroid, 1996*):

**primo livello:** ricerca di base e sperimentazione; identificazione e comprensione dei meccanismi di interazione tra alimento (o componente) e modulazione dell'espressione genica e di funzioni

biochimiche cellulari, al fine di dimostrare i potenziali effetti fisiologici

**secondo livello:** sviluppo di modelli e metodologie (ad esempio biomarker) per dimostrare attraverso studi di nutrizione umana questi effetti e le loro conseguenze, così da poter giustificare specifici *functional or physiological claims*

**terzo livello:** disegno di adeguati (e sufficientemente ampi) studi di nutrizione umana per dimostrare, al di là degli effetti funzionali, un beneficio sulla salute, compresa la prevenzione di malattie, così da autorizzare l'uso di *health claims*

## 1.4 HEALTH CLAIMS

Qualsiasi sia la definizione applicata “gli alimenti funzionali” rappresentano un concetto unico e meriterebbero di essere una categoria separata di alimenti, differente da nutraceutici, farmafood, medifood, designer food o vitafood, e separata anche dagli integratori dietetici. Da un punto di vista legislativo dunque, gli alimenti funzionali sono regolamentati in accordo con le “General Food Law Regulation”, ufficialmente indicate nel Regolamento EC No. 178/2002 del Parlamento Europeo, il cui scopo è quello di fornire le basi per assicurare un elevato livello di protezione della salute umana e degli interessi dei consumatori garantendo elevati standard di composizione, sicurezza, etichettatura, claims, etc.

L'aspetto maggiormente dibattuto attualmente è quello relativo agli health claims. Gli health claims rappresentano la ovvia conclusione delle fasi di ricerca e sviluppo in campo nutrizionale riguardo agli alimenti funzionali e si fondano sui risultati di queste attività scientifiche per poi essere successivamente tradotti in messaggi rivolti ai consumatori. Qualsiasi quadro normativo deve quindi tutelare i consumatori da affermazioni false e fuorvianti e soddisfare le esigenze di innovazione del settore nelle fasi di sviluppo, marketing e promozione del prodotto. Affinché i potenziali benefici per la salute degli alimenti funzionali si concretizzino, occorre una chiara

comprensione da parte dei consumatori e un elevato livello di fiducia nei criteri scientifici adottati per documentare gli effetti e le proprietà salutari.

Nell'ultimo decennio, partendo dalla Svezia, sono state adottate diverse iniziative volte a facilitare l'utilizzo degli health claims, quali l'adozione di linee guida e codici di comportamento negli Stati membri dell'UE, tra cui la Svezia, l'Olanda e il Regno Unito, quest'ultimo con la "Joint Health Claims Initiative" (JHCI). Nella maggior parte di questi Paesi, esperti del settore, autorità disciplinari, gruppi di consumatori e scienziati hanno collaborato per definire le norme di validazione scientifica, comunicazione e presentazione degli health claims. Negli USA, il Nutrition Labelling and Education Act (NLEA), stabilito nel 1994, ha ammesso su alcuni alimenti i claim relativi alla "riduzione del rischio di malattia". Tali claim sono autorizzati dall'americana Food and Drug Administration (FDA) sulla base della "totalità delle evidenze scientifiche pubbliche e qualora vi sia ampio consenso scientifico tra esperti qualificati sul fatto che i claims siano avvalorati da tali prove". Anche se le aziende possono utilizzare la comunicazione delle proprietà salutari per commercializzare i loro prodotti, l'intenzione dichiarata della FDA è far sì che gli health claims favoriscano il consumatore, fornendo informazioni su modelli alimentari sani che possano contribuire a ridurre il rischio di patologie come le malattie cardiache e il cancro. La FDA ha annunciato che gli health claims possono anche basarsi su dichiarazioni approvate da un Organismo Scientifico Federale, come i "National Institutes of Health" e i "Centres for Disease Control and Prevention", nonché la "National Academy of Sciences".

Il Codex Alimentarius, un programma nato dalla collaborazione tra l'Organizzazione per il Cibo e l'Agricoltura delle Nazioni Unite (FAO) e l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), è una raccolta di norme volta a definire una disciplina uniforme, nei diversi stati, sulla produzione ed il commercio dei prodotti alimentari, al fine di facilitare gli scambi internazionali, e garantire ai consumatori un

prodotto di standard elevato, sano e igienico, non adulterato oltre che correttamente presentato ed etichettato.

In assenza di una legislazione armonica sugli health claims, l'obiettivo dell'azione concertata della UE è stato quello di suggerire uno schema per correlare due tipi di health claims di grande rilevanza per gli alimenti funzionali, "enhanced function" claims e "reduced risk of disease" claims a prove scientifiche solide e sostenerne così lo sviluppo (Bellisle et al., 1998; Diplock et al., 1999; Roberfroid, 2002). Esistono due principali categorie di claim:

**Nutrition claim:** "Qualunque indicazione che affermi, suggerisca o sottintenda che un alimento ha particolari proprietà nutrizionali benefiche (energia, sostanze nutritive...)", relative, cioè, a ciò che il prodotto contiene.

**Health claim:** "Qualunque indicazione che affermi, suggerisca o sottintenda l'esistenza di un rapporto tra una categoria di alimenti, un alimento o uno dei suoi componenti e la salute" intesa anche come benessere e/o performance e che sono quindi relativi a come l'alimento o un suo componente agisce.

A quest'ultima categoria appartengono i claim riguardanti il "**miglioramento di una funzione biologica**" (Enhanced-function claims o tipo A) che si riferisce alle conseguenze positive dell'interazione tra un componente alimentare e una specifica funzione nell'organismo, senza diretto riferimento alla riduzione del rischio di malattia (un esempio è rappresentato dalla prevenzione dello stress ossidativo da parte di componenti antiossidanti) e la "riduzione del rischio di malattia" (Disease risk reduction claims o di tipo B) che si riferisce alla riduzione del rischio di malattia mediante il consumo di uno specifico o alla miscela di specifici componenti o ingredienti. Esempi di questo tipo di claim sono la riduzione del rischio di malattie cardiovascolari e cancro.

L'aspetto principale della comunicazione dei possibili benefici sulla salute riguarda il fatto che la valenza salutistica deve essere scientificamente sostanziata ovvero avere una completa evidenza scientifica il che significa che deve essere un dato oggettivo, ripetibile,



in grado di soddisfare gli standard ritenuti validi di significatività statistica e biologica e plausibile in termini di relazione tra intervento e risultato. La dimostrazione di un effetto che giustifichi un claim per la popolazione rimane un compito molto difficile e può richiedere studi nutrizionali a lungo termine con protocolli e criteri di valutazione che non necessariamente sono quelli attualmente in uso negli studi clinici per lo sviluppo di farmaci e comunque basato su ipotesi supportate da dati sul meccanismo d'azione responsabile dell'effetto che ci si attende.

Per implementare le conclusioni ed i principi del progetto FUFOS è stato condotto dal 2001 al 2005 un secondo programma di azione concertata dell'Unione Europea, il progetto Process for the Assessment of Scientific Support for claims on food (PASSCLAIM), che si è prefissato l'obiettivo di risolvere il problema relativo alla validazione e conferma scientifica dei claims mediante l'individuazione di criteri comuni.

In Europa è attualmente in vigore il Regolamento (EC) No. 1924/2006.

In base all'attuale quadro normativo, vi è un uso restrittivo degli health claim (EC 2006). A livello di packaging e marketing devono essere comunicati messaggi che evitino qualsiasi riferimento alla riduzione del rischio di malattia, anche qualora tali affermazioni siano avvalorate da prove scientifiche. La legislazione europea in materia di etichettatura vieta di attribuire a qualsiasi alimento la proprietà di prevenire, trattare o curare una malattia dell'uomo o di fare riferimento a tali proprietà. Allo stesso tempo, vi è ampio consenso sul fatto che gli health claims debbano essere correttamente formulati e non ingannevoli, per tutelare il consumatore, non devono mettere in secondo piano l'importanza di una dieta varia ed equilibrata e di uno stile di vita sano, promuovere il commercio e favorire la ricerca accademica e l'innovazione nell'industria alimentare.



---

## **2 I GLUCOSINOLATI E IL SULFORAFANE**

---

### **2.1 UN ESEMPIO DI COMPONENTE FUNZIONALE: I GLUCOSINOLATI**

Numerosi studi epidemiologici indicano che il consumo di frutta e verdura è associato con un ridotto rischio di malattie cronico-degenerative (*Block et al., 1992*). In particolare, è stata evidenziata una correlazione inversa tra l'assunzione di Crucifereae ed il rischio di molte forme di cancro e questa associazione è risultata essere più stringente rispetto a quella tra il rischio di cancro e l'assunzione di frutta e verdura in generale (*van Poppel et al., 1999*). Dal momento che le Crucifereae, in particolare i vegetali appartenenti al genere Brassica, sono caratterizzate in modo peculiare dal contenuto in glucosinolati (GLS), di cui rappresentano la principale fonte di assunzione della dieta umana, questi phytochemicals potrebbero essere responsabili degli effetti di promozione della salute (*Zhang, 2004*).

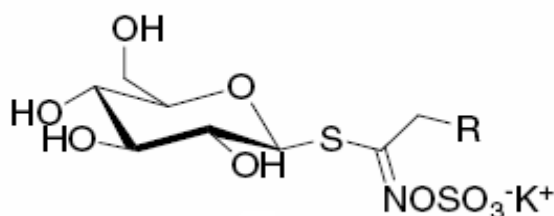
I glucosinolati (GLS) costituiscono un importante gruppo di fitocomponenti presenti in elevate quantità nei vegetali della famiglia delle Brassicaceae o Crucifereae come broccoli, tutti i tipi di cavolo, cavolfiori e cavolini di Bruxelles. Nelle piante, i GLS, ed i loro prodotti di degradazione, hanno proprietà fungicide, battericide, nematocide e la loro composizione varia in funzione della specie, del clima e delle condizioni di coltivazione (*Fahey et al., 2001*). Sono inoltre responsabili dell'odore e del gusto pungenti, tipici delle Crucifereae.

Dal punto di vista biologico i GLS sono composti relativamente inattivi (*Steinmetz et al., 1991; van Poppel et al., 1999*). In seguito al danneggiamento della cellula vegetale vengono a contatto con l'enzima mirosinasi, prodotto dalla stessa pianta, ma segregato in un

compartimento distinto rispetto al suo substrato con formazione di diversi prodotti di idrolisi. Tra questi, gli isotiocianati (ITC), sono quelli che hanno maggiormente attirato l'attenzione dei ricercatori, a causa delle loro interessanti proprietà biologiche. Alla loro attività sono da ricondurre molti degli effetti fisiologici attribuiti alle Brassicaceae in diversi tipi di studi, inclusi studi in vitro, animali, umani ed epidemiologici. In particolare, il sulforafane (SF) (1-isotiocianato-(4R)-(metilsulfinil)butano), un ITC prodotto a seguito dell'idrolisi del corrispondente glucosinolato glucorafanina, è stato ampiamente studiato per le sue proprietà chemiopreventive e antinfiammatorie.

## 2.2 STRUTTURA CHIMICA E PROPRIETÀ

La struttura base dei GLS è costituita da un  $\beta$ -D-tioglucosio, un'ossima sulfonata ed una catena laterale variabile derivata da metionina, triptofano, fenilalanina o vari amminoacidi ramificati (figura 2.1). La catena laterale ed il gruppo solfato possono presentare due diverse configurazioni stereochimiche attorno al doppio legame C=N. La struttura della catena laterale è molto variabile e può presentare gruppi alifatici (alchili, alchenili, idrossialchenili,  $\omega$ -metiltioalchili,  $\omega$ -sulfinili e  $\omega$ -sulfonilalchili), aromatici (benzili e benzili sostituiti) o eterocicli (indolo) e sono proprio tali gruppi a determinare le proprietà chimico-fisiche e specificità biologiche degli ITC derivanti dall'idrolisi dei GLS.



**Figura 2.1:** *Struttura base dei glucosinolati*

La presenza del gruppo solfato conferisce alla molecola intatta caratteristiche fortemente acide. Perciò non sono volatili e si presentano come sali, che hanno normalmente come controione il potassio, quindi hanno caratteristiche idrofile. I GLS, così come si trovano in natura, sono biologicamente inattivi; per avere un effetto biologico devono prima subire un'idrolisi.

## **2.3 IDROLISI**

Come già affermato, i GLS sono chimicamente e termicamente stabili, quindi l'idrolisi è prevalentemente di tipo enzimatico. La mirosinasi (EC 3.2.3.1) è una  $\beta$ -tioglucosidasi che viene rilasciata quando i tessuti vegetali vengono danneggiati, come, per esempio, durante la raccolta e il trasporto delle piante, la processazione o preparazione, oppure in seguito alla masticazione. L'enzima causa l'idrolisi del legame tioglucosidico producendo glucosio ed un aglicone instabile, il tioidrossiammato-*O*-sulfonato, che a seguito di un riarrangiamento spontaneo, porta a differenti prodotti, la cui struttura chimica dipende dalle condizioni di reazione (pH, presenza o meno di  $\text{Fe}^{2+}$  e specifiche proteine) e dalla catena laterale dei GLS da cui originano (figura 2.2a). L'enzima, analizzato ai raggi X, presenta una struttura dimerica legata da un atomo di zinco, e una caratteristica forma cosiddetta "a barile" (figura 2.2c). Una peculiarità della mirosinasi presente nelle piante è la sua attivazione ad opera dell'acido ascorbico, questo, infatti, agisce da base catalitica, con un effetto allosterico sull'attività dell'enzima (*Burmeister et al., 2000*).

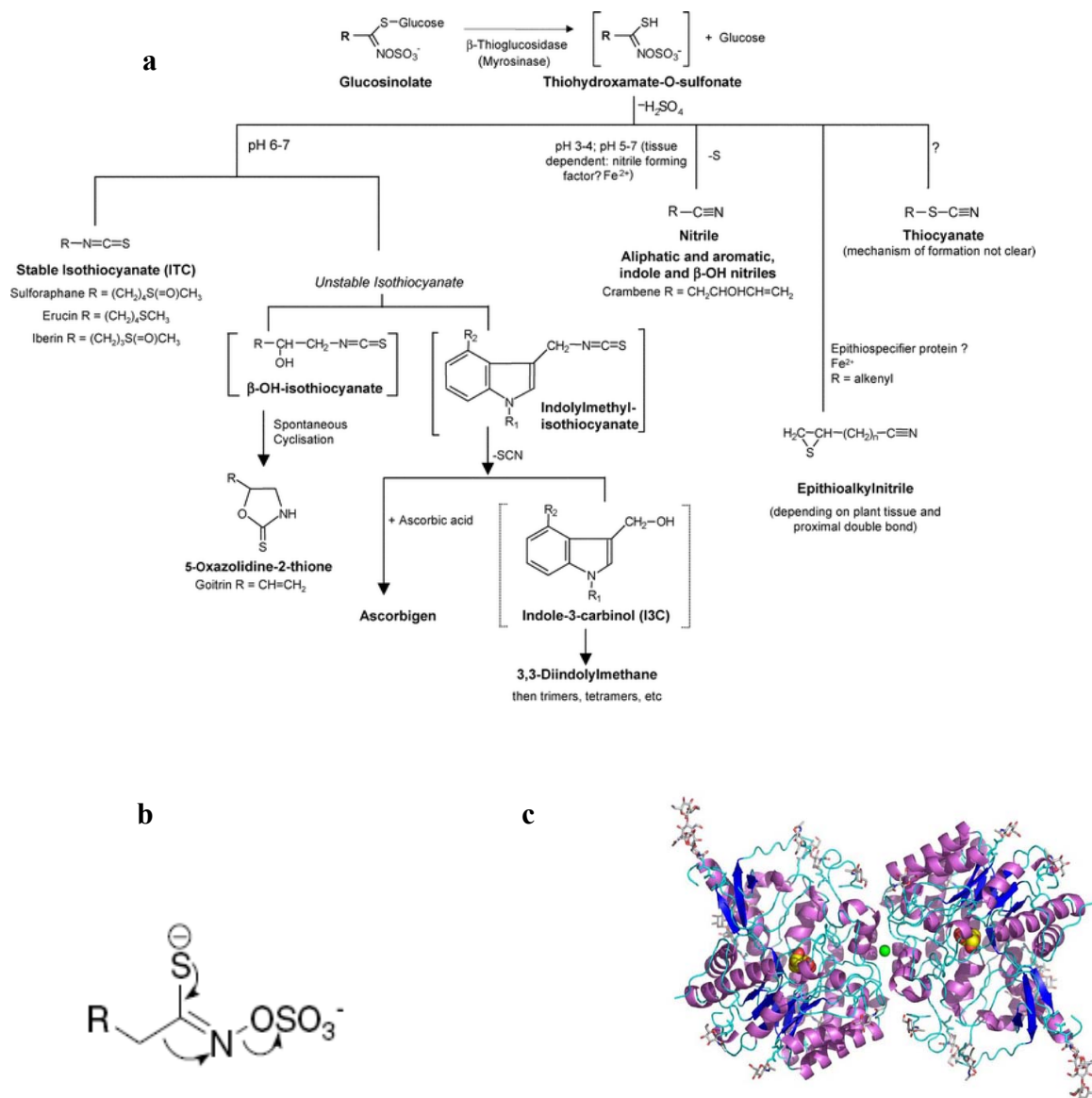
A pH 6-7 i prodotti più comuni sono gli isotiocianati (ITC), che si formano dai glucosinolati per azione della mirosinasi e successivo riarrangiamento di Lossen (figura 2.2b) (*Bones et al., 2006*). La cinetica dell'enzima differisce da specie a specie e più isoforme possono esistere anche all'interno della stessa pianta. In aggiunta all'enzima presente nelle piante, sono state identificate mirosinasi nei funghi, negli afidi e nei batteri, in particolare in batteri presenti nella microflora animale e umana. Ciò risulta molto importante in quanto

con la cottura dei cibi, la mirosinasi presente nei tessuti vegetali viene inattivata e i GLS ingeriti intatti vengono convertiti a ITC dalle mirosinasi presenti nella microflora intestinale. Nel complesso comunque l'assorbimento e l'escrezione risultano sostanzialmente inferiori nei vegetali cotti rispetto a quelle crudi (*Conaway et al., 2000*).

## **2.4 LIBERAZIONE, ASSORBIMENTO, DISTRIBUZIONE, METABOLISMO ED ESCREZIONE DEI GLUCOSINOLATI E DEI LORO PRODOTTI DI IDROLISI**

Per descrivere la concentrazione di un determinato composto al suo sito d'azione, è stato definito dalla *Food and Drug Administration* (FDA) il termine biodisponibilità come la “quantità ed estensione alle quali un farmaco viene assorbito e raggiunge il suo sito d'azione”. Un concetto di questo genere è fisicamente ed eticamente impossibile da determinare nell'uomo, quindi il termine “biodisponibilità assoluta” è spesso usato per descrivere l'esatta quantità di un composto che raggiunge la circolazione sistemica ed è calcolata come il rapporto tra l'area sottesa dalla curva (AUC) dopo ingestione orale e quella ottenuta in seguito a somministrazione intravenosa.

Prima che un determinato composto raggiunga una certa biodisponibilità all'interno dell'organismo, è soggetto a numerosi processi: (1) **liberazione**, rilascio e dissoluzione del composto affinché diventi disponibile per l'assorbimento (bioaccessibilità); (2) **assorbimento**, il movimento di un composto dal sito di assorbimento alla circolazione ematica; (3) **distribuzione**, il processo per il quale un composto diffonde o è trasferito dallo spazio intravascolare allo spazio extravascolare; (4) **metabolismo**, la conversione biochimica, o trasformazione di un composto in forme più facilmente eliminabili; e (5) **escrezione**, l'eliminazione dall'organismo del composto o dei suoi metaboliti/coniugati per via renale, biliare o polmonare.



**Figura 2.2:** **a)** Schema dei vari prodotti di idrolisi derivanti dall'azione della mirosinasi sui glucosinolati (Holst et al., 2004); **b)** Riarrangiamento di Lossen che conduce alla formazione di ITC; **c)** Struttura dimerica della mirosinasi con un atomo di zinco al centro (Bones et al., 2006).

### **2.4.1 Liberazione e assorbimento**

Per liberazione si intende il rilascio del composto dalla matrice alimentare e la sua dissoluzione nei fluidi biologici. Questa fase è indispensabile per fare in modo che il composto arrivi, a livello della mucosa intestinale, in una forma che gli permetta di essere assorbito dagli enterociti, attraverso diffusione passiva, passaggio attraverso le giunzioni cellulari o utilizzando trasportatori specifici.

La liberazione dei GLS dalla matrice vegetale e la loro trasformazione a ITC dipende da svariati fattori :

- concentrazione di GLS nelle piante
- idrolisi dovuta a danneggiamento dei tessuti vegetali durante lavorazioni e immagazzinamento
- caratteristiche chimico-fisiche dei GLS e corrispondenti ITC e loro stabilità
- livello di rottura dei tessuti durante la masticazione
- efficienza digestiva e dei processi intestinali
- azione della microflora intestinale

Oltre alla concentrazione di GLS e ai trattamenti subiti dai cibi, anche la matrice vegetale influisce sulla liberazione e l'assorbimento (*Conaway et al., 2000*).

La dissoluzione di un composto e il suo assorbimento sono determinati dalla sua solubilità in ambiente acquoso, dalla ionizzazione ( $pK_a$ ), e dalla lipofilia, definita dal coefficiente di partizione acqua-ottanolo ( $\log P$ ), che risulta un fattore cruciale per la partizione passiva ai lati della membrana plasmatica. E' stato suggerito che l'assorbimento intestinale sarebbe ottimale per un  $\log P$  compreso tra 0.5 e 2.0.

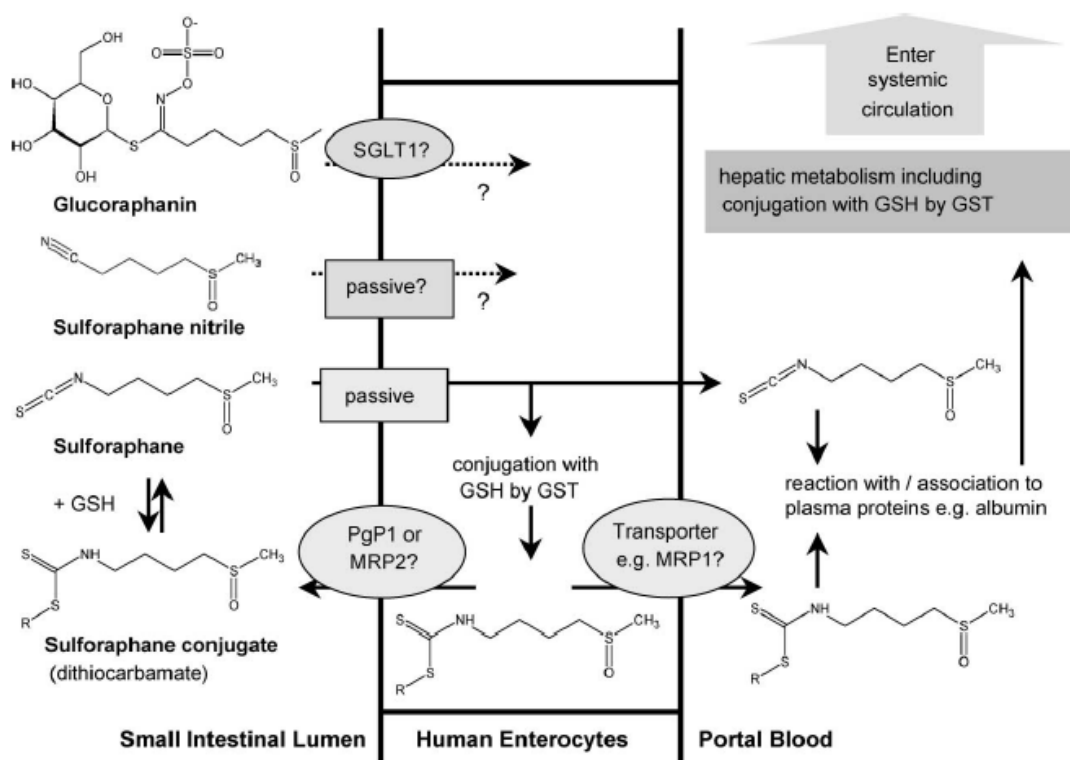
Il gruppo solfato presente nella struttura dei GLS li rende fortemente acidi, e per un GLS intatto si può predire una  $pK_a$  di circa 1.9. Con tale  $pK_a$  la diffusione passiva può avvenire solamente a livello dello stomaco, ma questo, avendo solo una piccola superficie disponibile,



non costituisce il maggior sito di assorbimento. I GLS sono composti ionizzati e idrofili, motivo per cui non permeano facilmente la membrana cellulare. È stato quindi predetto che vengano assorbiti attraverso pori acquosi o mediante trasporto attivo. La presenza di un gruppo glucoside nella molecola potrebbe suggerire il trasporto attivo attraverso il trasportatore del glucosio, ma studi in vitro hanno dimostrato che nessuno dei GLS viene attivamente assorbito lungo il tratto dell'intestino preso in esame, come avviene per il glucosio; è stato invece riscontrato un passaggio per trasporto facilitato. In contrasto con questo risultato ottenuto da studi su un modello animale, Shapiro et al., non hanno riscontrato la presenza di GLS intatti nelle urine di soggetti che avevano consumato quantità sostanziali di GLS (Shapiro et al., 1998). Dal momento che il campione considerato è estremamente ristretto e la fonte di glucosinolati utilizzata è costituita da un solo tipo di alimento, questi risultati non possono essere considerati conclusivi. Ulteriori studi, in particolare sull'uomo, saranno necessari per chiarire il possibile assorbimento di GLS intatti, il meccanismo coinvolto e le possibili limitazioni di un modello animale.

La disponibilità tissutale di ITC è circa sei volte maggiore di quella dei GLS di partenza (Shapiro et al., 2001). La maggior parte dei prodotti di idrolisi dei GLS non ha gruppi acidi o basici e così, per esempio, si può predire che il log P sia indipendente dal pH e abbia un valore compreso tra 0.2 e 4.4. Sono inoltre composti molto più lipofili e hanno un peso molecolare relativamente basso per cui il loro assorbimento può avvenire, almeno in parte, per diffusione passiva.

Il SF ha un peso molecolare di 177 g/mol e un log P di 0.72 (Cooper et al., 1997), per cui una volta formatosi, a livello del cavo orale in seguito a masticazione o nell'intestino ad opera della microflora, viene rapidamente assorbito, come dimostrato in uno studio in situ sul digiuno umano, nel quale l'effettiva permeabilità intestinale del SF viene stimata pari a  $18.7 \pm 12.6 \times 10^{-4}$  cm/s e la percentuale di assorbimento pari a  $74 \pm 29\%$  (Petri et al., 2003).



**Figura 2.3:** meccanismo ipotizzato per l'uptake cellulare ed il metabolismo di primo passaggio del sulforafane (Holst et al., 2004).

Uno studio sulla biodisponibilità assoluta e farmacocinetica del SF nel ratto (Hanlon et al., 2008) ha evidenziato il raggiungimento della  $C_{max}$  plasmatica dopo 1 h dalla somministrazione di un range di dosi da 0.5 a 5mg/kg, rappresentative di una assunzione dietetica di SF ed una biodisponibilità pari all'80% alla dose più bassa testata (0.5mg/kg). Lo studio ha anche evidenziato che le concentrazioni plasmatiche e la biodisponibilità erano inversamente proporzionale alla dose, sollevando la possibilità che SF possa essere assorbito, almeno in parte, con un meccanismo di trasporto carrier mediato, che a dosi elevate risulta essere saturato. Queste osservazioni suggeriscono che l'assunzione di SF attraverso integratori potrebbe non essere efficace come si pensa per raggiungere elevate concentrazioni plasmatiche.

Gli ITC all'interno della cellula vengono coniugati con il glutathione (GSH), ad opera dell'enzima glutathione-S-transferasi. È stato dimostrato che elevati livelli cellulari di GSH corrispondono ad un aumento dell'uptake di ITC nella cellula. Inoltre, l'uptake iniziale aumenta linearmente con l'aumento di una specifica glutathione-S-transferasi, e non sembra essere influenzato dalla lipofilia degli ITC (Zhang, 2001).

Gli ITC accumulati a livello intracellulare come GSH-coniugati sono rapidamente escreti ed in questo meccanismo risultano coinvolte una proteina associata alla resistenza ai farmaci, la multidrug resistance associated protein-1 (MRP-1) e la glicoproteina P (Pgp-1) (figura 2.3) (Callaway et al., 2004; Zhang et al., 2002). Questo meccanismo è stato verificato essere attivo anche in vivo (Petri et al., 2003).

In alcuni studi su animali è stato dimostrato che gli ITC possono anche essere coniugati con cisteina ma, è verosimile pensare, che tali prodotti si dissocino prima di essere assorbiti dalla cellula mediante diffusione passiva e vengano poi coniugati a livello intracellulare con il GSH (Brusewitz et al., 1977; Gorler et al., 1982). L'equilibrio tra ITC liberi e legati è la proprietà chiave che facilita il passaggio attraverso la membrana cellulare e, la coniugazione con GSH all'interno della cellula è la forza guida per la diffusione passiva e l'accumulo di ITC.

Oltre che dalle caratteristiche del composto in esame comunque, l'assorbimento dipende anche da svariati fattori fisiologici quali l'espressione di determinati trasportatori, il riempimento gastrico, la motilità gastrointestinale, il pH, il flusso sanguigno e linfatico e la presenza di stati patologici. Tutti questi parametri non sono fino ad ora stati considerati negli studi sull'assorbimento dei GLS e derivati.

#### **2.4.2 Distribuzione**

La distribuzione coinvolge il movimento di un composto tra il sangue ed i tessuti dell'organismo. I principali parametri che condizionano la distribuzione sono il flusso sanguigno, le barriere create dalle membrane, l'affinità per i tessuti e la presenza nel sangue di proteine

plasmatiche quali albumina e glicoproteine, che legano i composti e li trasportano attraverso il circolo sanguigno. Finché un composto si trova legato a tali proteine non è in grado di raggiungere il suo sito d'azione e non può svolgere alcuna azione biologica. Risulta quindi importante verificare quale frazione del composto assorbito risulta libera, cioè non legata alle proteine plasmatiche. Tale valore dipende, sia dalla concentrazione del composto sia da quella delle proteine e naturalmente dalla costante di associazione che caratterizza il legame. Basandosi sulla struttura chimica e sulle proprietà dei GLS appare inverosimile che possano essere assorbiti e distribuiti immodificati nell'organismo umano, mentre i loro prodotti di degradazione, o i metaboliti di questi ultimi, sono distribuiti in tutto l'organismo e raggiungono differenti tessuti.

Recentemente, Ye et al. (2002) hanno sviluppato un metodo appropriato e sensibile, che ha reso possibili gli studi di farmacocinetica nell'uomo. È stato osservato che, in seguito ad un rapido assorbimento e comparsa nel plasma ( $0.94 \pm 2.27 \mu\text{mol/l}$ ), i livelli di picco degli ITC provenienti dai broccoli (in maggioranza sulforafane, iberina ed euricina) diminuiscono, dimostrando una rapida distribuzione, che segue una cinetica del primo ordine con una emivita di  $1.77 \pm 0.13 \text{ h}$  (Ye et al., 2002).

La rapida diminuzione osservata delle concentrazioni plasmatiche dopo somministrazione orale ed intravenosa riflette l'uptake cellulare. Gli ITC, quali SF, raggiungono concentrazioni intracellulari molto elevate come risultato della loro interazione con il GSH (Ye et al., 2001; Zhang, 2000).

Questa rapida coniugazione con GSH e possibilmente altri tioli, il gradiente di concentrazione facilita l'ulteriore uptake cellulare degli ITC, che può raggiungere concentrazioni mM a livello intracellulare, fino a 200 volte quelle presenti a livello extracellulare, come dimostrato da studi in vitro (Zhang, 2004) ed è accompagnato da una marcata diminuzione dei livelli di GSH (Conaway et al., 2005).

Gli ITC si legano fortemente alle proteine plasmatiche, probabilmente per interazione coi gruppi -SH e, solo in piccola parte, in forma libera.

È plausibile che a dosi elevate i siti di legame siano saturati cosicché il SF rimane libero e disponibile per essere metabolizzato ed escreto. Ad esempio, l'albumina contiene un solo residuo cisteinico libero (Cys 34). Il fatto che sia osservabile una diminuzione dose-dipendente dell'emivita concorda con questo meccanismo di trasporto e distribuzione ipotizzato (*Hanlon et al., 2008*).

La distribuzione ai singoli tessuti coinvolge il passaggio dei composti attraverso le membrane e questo segue lo stesso meccanismo di uptake descritto per l'assorbimento intestinale. La forza guida per la diffusione passiva degli ITC attraverso le membrane è la coniugazione con il GSH. In base a questi dati è quindi possibile ipotizzare che gli effetti organo-specifici degli ITC dipendano dalla concentrazione di GSH nei diversi tessuti.

Da uno studio, effettuato somministrando a dei ratti ITC marcati con carbonio 14, è stato possibile evidenziare che a parte il tratto gastrointestinale, il fegato e i reni, che sono gli organi deputati all'assorbimento e all'escrezione, solo il sangue contiene elevati livelli di radioattività, concentrazioni intermedie si trovano nel pancreas e nella milza e bassissime concentrazioni sono state identificate a livello di cuore e cervello (*Conaway et al., 1999*).

#### ***2.4.3 Metabolismo ed escrezione***

In senso generale, il termine metabolismo comprende tutti i processi che portano a cambiamenti strutturali o degradazione della molecola. Modificazioni della struttura molecolare possono risultare da reazioni enzimatiche e non enzimatiche all'interno dell'organismo.

La biodisponibilità di un composto, anche se assorbito in elevate concentrazioni, può essere limitata da un rapido ed esteso metabolismo. Risulta quindi importante determinare quali sono i metaboliti di tale composto e in che concentrazioni si ritrovano nel sangue, nelle urine o nelle feci.

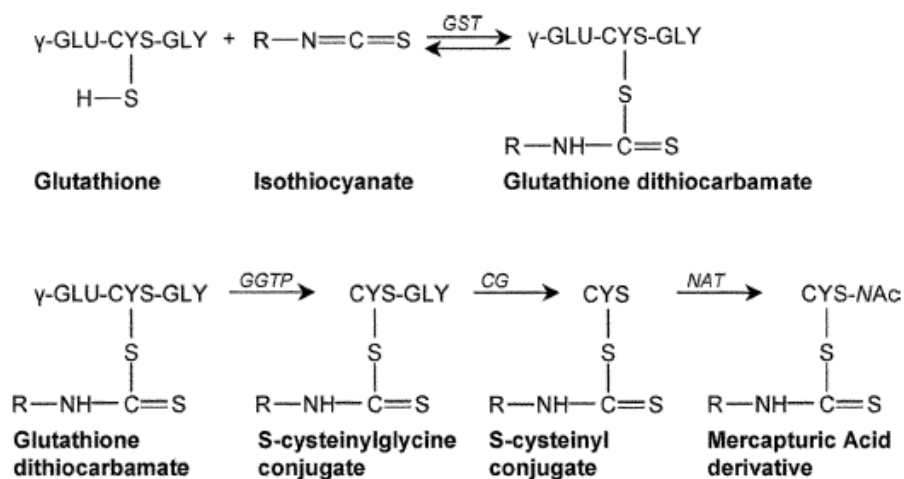
Il fatto che non siano presenti GLS come tali nelle feci suggerisce che questi composti siano sottoposti ad un esteso metabolismo. Come già detto, i GLS vengono idrolizzati a ITC ad opera dell'enzima

mirosinasi a livello del cavo orale in seguito a liberazione dell'enzima dalla matrice vegetale, o a livello intestinale ad opera della microflora. Il primo passo del metabolismo degli ITC è la coniugazione con GSH. Non è chiaro se questa coniugazione avvenga nel duodeno durante l'assorbimento, oppure nel fegato, che è il sito con la più alta attività glutatione transferasica. Successivamente, gli ITC coniugati vengono metabolizzati da differenti enzimi quali ad esempio la glutamiltranspeptidasi (GTP), la cisteinilglicinasi (CGase) e la N-acetiltransferasi (NAT) che portano alla formazione dei diversi metaboliti mostrati in figura 2.4.

Tale sequenza di reazioni conduce di norma alla formazione di acido mercapturico, un metabolita che, data la sua idrofilia, può facilmente essere escreto con le urine (*Keum et al., 2004*) (fig.2.4).

In seguito a somministrazione di 100 g di broccoli, nelle urine sono stati identificati sia il SF libero che i suoi metaboliti SF-N-acetilcisteina, SF-cisteina e SF-cisteinglicina in concentrazioni da 1 a 16  $\mu\text{M}$  e il composto SF-N-acetilcisteina è stato identificato come il maggior metabolita (*Al Janobi et al., 2006*).

L'eliminazione di SF è caratterizzata da una lunga fase terminale, infatti non sono osservabili grandi differenze nella concentrazione plasmatica tra le 6 e le 24 h dopo somministrazione orale ed intravenosa a basse dosi; probabilmente questa è una conseguenza del legame con le proteine o GSH che rende gli ITC non disponibili per l'eliminazione attraverso il metabolismo e successiva escrezione (*Hanlon et al., 2008*).



**Figura 2.4:** Metabolismo degli ITC in vivo: Gli ITC formati vengono coniugati con il glutathione dall'enzima glutathione S-transferasi (GST), quindi metabolizzati tramite una serie di reazioni catalizzate dagli enzimi  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasi (GGTP), cisteinilglicinasi (CGase), e N-acetiltransferasi (NAT). Questa serie di reazioni conduce alla formazione di acido mercapturico che viene escreto con le urine. Per il sulforafane il gruppo R è  $\text{CH}_3\text{SO}(\text{CH}_2)^4-$  e il suo precursore nelle piante è chiamato glucorafanina (Holst et al., 2004).

## 2.5 VALUTAZIONE SPERIMENTALE DELL'UPTAKE DI ITC NELL'UOMO IN SEGUITO AD ESPOSIZIONE DIETETICA

In accordo con l'osservazione che ITCs sono prontamente assorbiti e metabolizzati in vivo principalmente attraverso la via degli acidi mercapturici e successivamente escreti nelle urine come N-acetilcisteina coniugati (NAC), numerosi studi hanno mostrato che l'assunzione dietetica di ITC può essere valutata dalla misura degli NAC coniugati nelle urine, che risultano quindi essere un marker di esposizione affidabile.

Il saggio di ciclocondensazione che porta alla formazione di ditiocarbammati (DTC) è un metodo quantitativo estremamente sensibile per la determinazione degli ITC e dei loro metaboliti (chiamati collettivamente ITC equivalenti) ed è un valido strumento per lo studio del consumo dietetico, soprattutto nel caso in cui l'identità degli ITC o le modificazioni che queste molecole subiscono in vivo nel corso del metabolismo non sono ancora completamente conosciute, dal momento che misura la quantità totale di ITC/DTC (*Zhang et al., 1996*)

È stato dimostrato che la quantità totale di ITCs/DTCs è associata in modo significativo con l'assunzione di Cruciferae (*Shapiro et al., 1998*)

Utilizzando questo saggio, Ye et al. hanno dimostrato in uno studio condotto su volontari, che l'assunzione di una singola dose di estratto di germogli di broccoli contenente 200  $\mu\text{mol}$  ITCs, in cui tutti i glucosinolati erano stati idrolizzati e la maggior parte degli ITC erano costituiti da SF (77.2% di SF e 22.8% di iberina, isotiocianati alifatici con struttura chimica simile), gli ITC erano assorbiti rapidamente e raggiungevano un picco di concentrazione plasmatica di 0.94-2.27  $\mu\text{mol/L}$ , 1 h dopo l'ingestione, che declinava secondo una cinetica di primo ordine. L'escrezione cumulativa di ITC equivalenti ad 8 h corrispondeva al  $58.3 \pm 2.8\%$  della dose ingerita (*Ye et al., 2002*). In un esperimento simile l'escrezione cumulativa di ITC equivalenti dopo 72 h era  $88.9 \pm 5.5\%$  della dose assunta.

Shapiro et al. hanno inoltre verificato che in soggetti a cui venivano soministrate dosi ripetute di 50  $\mu\text{mol}$  di ITC, presenti nei germogli di broccoli, la variabilità intra- ed inter-soggetto nell'escrezione urinaria di ITCs equivalenti era piccola (coefficiente di variazione 9%), e che per dosi scalari, l'escrezione urinaria nelle 72 h era lineare all'interno di un range compreso tra 25–200  $\mu\text{mol}$ , (*Shapiro et al., 2001*), confermando la validità di questo parametro come biomarker di esposizione umano all'assunzione dietetica di ITC.



## **2.6 BIODISPONIBILITÀ DEI PRODOTTI DI IDROLISI DEI GLUCOSINOLATI NELLA DIETA UMANA**

La comprensione dei fattori che vincolano il rilascio delle componenti fitochimiche dalla matrice alimentare, il loro assorbimento e il loro destino all'interno dell'organismo è fondamentale per determinare il meccanismo d'azione e l'effetto biologico.

Vi sono diversi fattori che possono influenzare l'esposizione agli ITC ed ai GLS precursori: la varietà, la genetica della biosintesi dei GLS all'interno della pianta (*Kushad et al., 1999; Mithen, 2001*), da fattori agronomici e ambientali, quali le condizioni del suolo e climatiche (*Ciska et al., 2000; Pereira et al., 2002; Vallejo et al., 2003*), ma anche i processi di immagazzinamento e tecnologici che i vegetali subiscono prima del consumo e la cottura (*Verkerk et al., 2008*).

Fino al 50% del contenuto di GLS totali può essere perso in seguito ad una conservazione in freddo, mentre il taglio favorisce l'idrolisi solo sulla superficie tagliata. Quindi nelle foglie larghe intatte o nelle infiorescenze di broccoli o cavolfiori c'è una perdita minima di GLS prima della cottura. Se questi vegetali sono ingeriti crudi, vengono assunti sia GLS intatti, sia mirosinasi attiva simultaneamente, il che favorisce l'idrolisi dei GLS, che avviene lungo il tratto gastrointestinale. Alcuni dei GLS ingeriti vengono idrolizzati nel colon ad opera di mirosinasi batteriche, comunque la mirosinasi contenuta nella pianta appare il fattore dominante.

Ammettendo che vi sia una larga perdita di GLS nell'acqua di cottura (tra il 30 ed il 60%), data la loro idrofilia, è evidente che il metodo di preparazione può fare una grande differenza sia sull'assunzione di GLS, sia sulla biodisponibilità dei loro prodotti di idrolisi. Un fattore importante nel determinare i livelli di assunzione di ITC è l'influenza combinata della cottura e della microflora nel tratto intestinale: condizioni di cottura blande (meno di 75-80° C) causa una aumentata produzione di ITC consentendo il rilascio di mirosinasi, ma la mirosinasi si denatura rapidamente quando la temperatura raggiunge i 90°C (*Dekker et al., 2002*)

In uno studio disegnato per comparare la biodisponibilità di ITC in broccoli crudi e cotti al vapore ai volontari è stato chiesto di assumere 200g di broccoli. Il contenuto di ITC nella preparazione iniziale era circa identico (1.1 e 1.0 micromol/g peso fresco) tuttavia l'escrezione urinaria di ITC nelle 24 h risultava il 32.3% per i broccoli crudi e 10.25% il che indica che la biodisponibilità di ITC nei vegetali crudi, dove la mirosinasi non era stata inattivata dal calore, era 3 volte superiore (*Conaway et al., 2000*)

Similmente, in seguito a somministrazione di un estratto di germogli di broccoli contenente solo ITC (dopo completa idrolisi) o solo GST (in cui la mirosinasi era stata completamente inattivata), l'escrezione urinaria cumulativa nelle 72h di ITC equivalenti risultava pari all'80% e al 12% della dose, rispettivamente (*Shapiro et al., 2001*)

Questi studi mostrano chiaramente che i vegetali in cui la mirosinasi è ancora funzionale procurano una quantità di ITC molto più grande rispetto a quelli in cui la mirosinasi è inattiva. D'altra parte diversi tipi di Crucifere compresi broccoli e cavoli hanno dimostrato di formare nitrili (senza proprietà chemiopreventive conosciute) come prodotti di idrolisi dei GLS (*Bones et al., 2006; Matusheski et al., 2006*). Queste crucifere contengono una proteina, chiamata proteina epithiospecifier (ESP) o proteina ESP-like, che sembra essere responsabile della formazione degli epitionitrili. L'ESP non catalizza i GLS da sola, ma agisce come cofattore di mirosinasi indirizzando i prodotti instabili dell'idrolisi verso gli epitionitrili piuttosto che ITC. L'ESP è maggiormente termolabile della mirosinasi e pertanto un trattamento termico blando e breve può portare ad un'alta produzione di ITC, poiché rende inattiva l'ESP lasciando attiva una certa quantità di tirosinasi (*Bones et al., 2006*).

E' anche evidente che l'attività mirosinasica esercitata dalla microflora intestinale può idrolizzare solo una piccola frazione dei GLS ingeriti (*Getahun et al., 1999; Krul et al., 2002*). Ciò non ostante quando la microflora viene ridotta da una combinazione di rimozione meccanica e terapia antibiotica vi è una ulteriore riduzione nell'escrezione urinaria nelle 72 h di ITC equivalenti da  $11.3 \pm 3.1\%$  a

$1.3 \pm 1.3\%$  della dose (*Shapiro et al., 1998*). Anche le abitudini alimentari possono influenzare l'esposizione agli ITC. Per esempio, in uno studio in cui ad ogni soggetto veniva chiesto di non masticare o masticare a lungo 12g di broccoli crudi contenenti 109  $\mu\text{mol}$  di GLS totali, la masticazione risultava in una escrezione molto maggiore di ITC equivalenti ( $42.4 \pm 7.5\mu\text{mol}$  contro  $28.8 \pm 2.6\mu\text{mol}$ , rispettivamente) (*Shapiro et al., 2001*).

## **2.7 STIMA DELL'ASSUNZIONE DEI GLUCOSINOLATI NELLA DIETA UMANA**

Un'analisi recente a livello europeo (*IARC, 2004*) relativa al consumo di Crucifere ha evidenziato che questo varia da 5 a 30g/die, identificando zone caratterizzate da un basso consumo, in paesi quali Spagna e Grecia (11 e 13 g/die rispettivamente), i cui livelli sono leggermente più bassi rispetto a Svezia, Danimarca e Italia in cui l'apporto giornaliero stimato risulta complessivamente inferiore a 20g al giorno. In Francia e Olanda il consumo giornaliero è tra 20 e 30g, mentre Germania, Norvegia e Regno Unito superano i 30g/die. Questo schema è molto diverso se raffrontato a quello del consumo complessivo di frutta e verdura, che mostra invece un gradiente netto Sud-Nord. A livello mondiale i paesi in cui il consumo di crucifere è maggiore risultano essere la Cina, con oltre 100g/die, seguita da altri paesi asiatici e dall'Australia con valori compresi tra 40 a 80g/die. L'apporto medio giornaliero negli Stati Uniti si attesta attorno ai 25-30g al giorno, mentre un consumo veramente basso caratterizza il Sud Africa ed alcuni paesi del Sud America. Dai dati raccolti risulta che nei paesi con una elevata assunzione di crucifere, queste costituiscono una porzione notevole del consumo totale di frutta e verdura

Al contrario, le stime del consumo di GLS nella popolazione sono scarse, probabilmente per la mancanza di tabelle di composizione degli alimenti; la larga variabilità biologica del profilo dei glucosinolati e la loro concentrazione nella pianta integra, insieme agli effetti della conservazione, lavorazione e cottura degli alimenti e una

distribuzione ampia ma non ubiquitaria nella dieta umana, rendono molto difficile anche solo una stima dell'assunzione giornaliera. Ciò nonostante in numerosi studi si è assunto che l'apporto giornaliero di vegetali del genere *Brassica* riflettesse l'apporto giornaliero di GLS e dei loro prodotti di idrolisi; nella maggior parte dei casi si tratta di stime approssimative basate sul consumo complessivo di crucifere e sui pochi dati relativi al contenuto in GLS in alcuni alimenti.

Il consumo medio giornaliero di GLs totali nel Regno Unito è stato stimato essere circa 50 mg, mentre in Olanda l'assunzione media risulta 22 mg/die. Altre stime disponibili riguardano gli indol GLS: l'assunzione giornaliera in mg di glucobrassicina e neo glucobrassicina (i due principali GLS indolici della dieta) era 22.5 nel regno Unito, 5.5 in Danimarca e 2.8 in Finlandia. Negli USA (*Broadbent et al., 1998*) l'assunzione di GLS indolici era circa 22.5mg/die pro capite (*IARC, 2004*).

Un'importante considerazione quando si confronta l'assunzione di GLS nei vari paesi è il tipo di crucifere più comunemente consumata, che può variare secondo le preferenze personali e culturali. Questo può avere un importante impatto sull'effettiva assunzione di GLS. Per esempio, tipi di Crucifere con percentuali basse di consumo possono contribuire in modo sostanziale all'apporto di GLS totale perché estremamente ricchi di queste sostanze, come ad esempio cavolini di Brussel e germogli di broccoli.

---

### **3 SISTEMA ANTIOSSIDANTE ENDOGENO**

---

#### **3.1 LE PRINCIPALI DIFESE ANTIOSSIDANTI ENDOGENE**

Gli effetti dei radicali liberi possono essere estremamente gravi: la loro possibilità di attaccare teoricamente qualsiasi molecola del nostro organismo determina la produzione di numerosi tipi di danno a livello di cellule, di organi e di apparati. I radicali liberi sono implicati nell'eziopatogenesi di numerose patologie, e nel fenomeno fisiologico dell'invecchiamento.

L'organismo umano possiede dei sistemi di difesa estremamente efficaci, come enzimi in grado di sequestrare direttamente o indirettamente le specie reattive dell'ossigeno, o sostanze che funzionano da trappole chimiche nei confronti dei radicali liberi.

Difese aggiuntive vengono fornite da vitamine, minerali ed altri elementi assunti con la dieta. In generale, queste sostanze non sono sintetizzate dall'organismo ed hanno funzioni correlate con i sistemi enzimatici quali cofattori, coenzimi, elementi in tracce legati a ligandi organici o hanno essi stessi proprietà antiossidanti.

Gli antiossidanti si possono classificare in antiossidanti primari e secondari. Questa classificazione si basa non su un criterio di importanza, ma di sequenza temporale di azione. Fra i primari vi sono gli enzimi che catalizzano le trasformazioni dei ROS (SOD, CAT e GPx), le molecole chelanti i metalli e le molecole in grado di agire come scavenger dell'ossigeno singoletto ( $^1O_2$ ). Gli antiossidanti secondari hanno, invece, la funzione di implementare le difese antiossidanti ripristinando, per esempio, il pool dei tioli oltre ad agire di per se come scavenger dei radicali liberi, fra questi ricordiamo: le vitamine A ed E, la vitamina C, il coenzima Q, e i polifenoli.

Gli scavenger idrofobici si trovano nelle membrane cellulari dove inibiscono o interrompono reazioni a catena della perossidazione

lipidica. Gli scavenger idrofilici si trovano nel citosol, nei mitocondri e nel nucleo.

Nei paragrafi successivi verrà focalizzata l'attenzione sulle principali difese antiossidanti.

### **3.2 ANTIOSSIDANTI PRIMARI: ENZIMI PROTETTIVI**

Gli enzimi con funzione antiossidante sono deputati alla distruzione di superossidi e idroperossidi. Il vantaggio che deriva dalla loro azione è che la concentrazione di perossidi allo stato stazionario può essere adattata ai requisiti della cellula: molti enzimi possono essere indotti, inibiti o attivati da effettori endogeni (*Harris, 1992*).

La degradazione enzimatica del superossido è assicurata dalla SOD, mentre quella dell'idroperossido è realizzata da CAT, GPx o ascorbato perossidasi. Sia SOD che CAT sono delle dismutasi, in questo modo, le reazioni primarie catalizzate da questi enzimi non sono associate ad alcun costo energetico. Al contrario la GPx e l'ascorbato perossidasi sono delle reduttasi i cui substrati ridotti sono rigenerati dagli equivalenti di NADPH prodotti nelle vie metaboliche (*Chaudiere et al., 1999*).

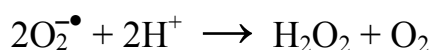
#### **3.2.1 Superossido dismutasi**

La famiglia delle SOD è costituita da metalloenzimi ampiamente distribuiti sia nelle cellule eucariote che procariote (*Fridovich, 1995*). La caratteristica che accomuna tutte le isoforme della SOD è la capacità di catalizzare la dismutazione dell'anione superossido ( $O_2^{\bullet-}$ ) a perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ).

Le diverse isoforme dell'enzima, codificate da geni diversi, si caratterizzano, oltre che per il diverso catione metallico che funge da cofattore, anche per la diversa compartimentazione; si distinguono una SOD1 citoplasmatica, una SOD2 mitocondriale e una SOD3 extracellulare. Per quanto riguarda la classificazione delle isoforme in funzione dei diversi cationi metallici contenuti si distinguono una Cu, Zn SOD, principalmente intracellulare, una Mn SOD, principalmente

mitocondriale, mentre in alcuni procarioti e piante sono state individuate anche la Ni SOD e la Fe SOD.

La SOD catalizza la dismutazione del superossido in perossido di idrogeno ed ossigeno.

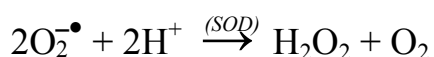
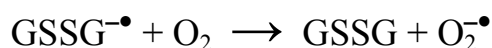
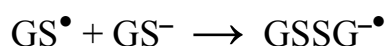
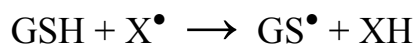


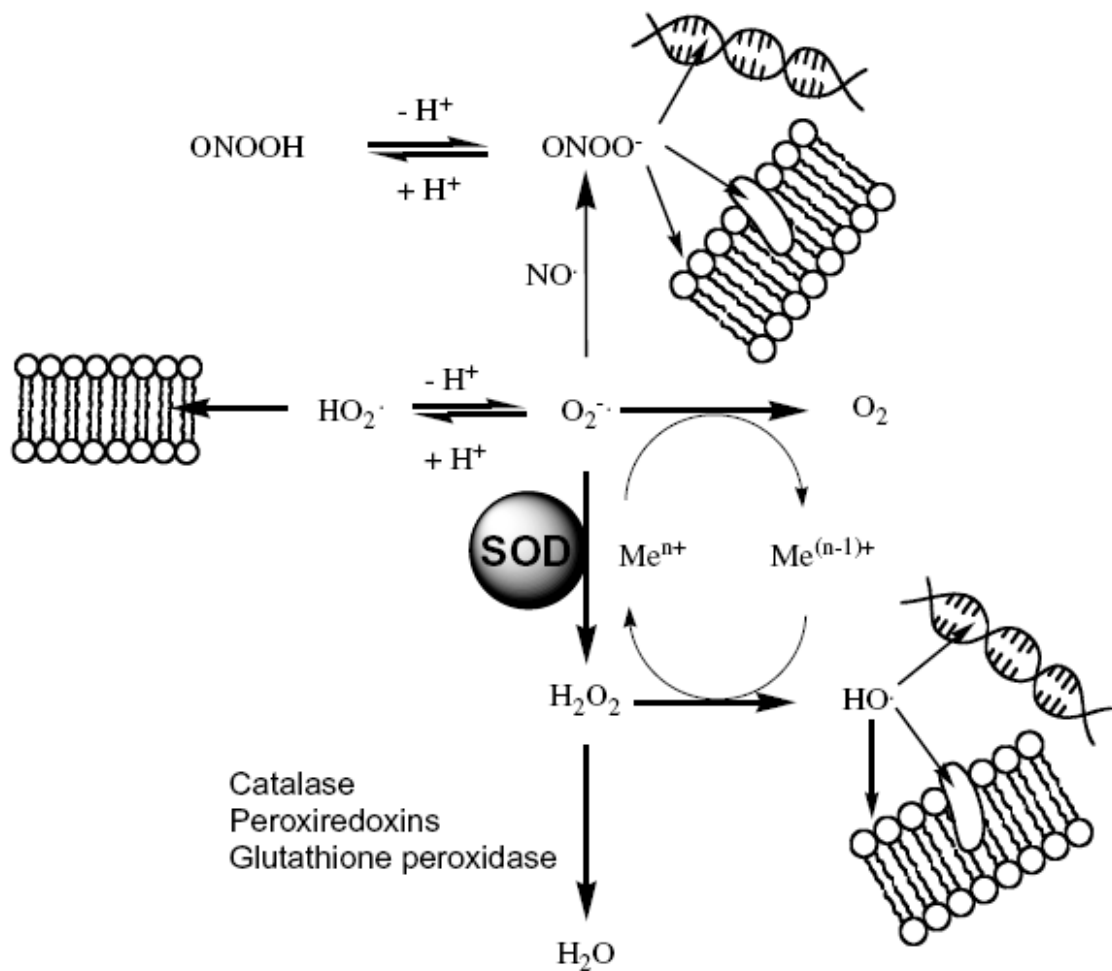
A pH fisiologico la velocità di dismutazione non enzimatica è significativa, ma è notevolmente maggiore in presenza di SOD, che determina un aumento della velocità di dismutazione del radicale superossido di 1000 volte.

Il fatto che la concentrazione intracellulare del  $\text{O}_2^{\bullet-}$  vari da  $10^{-6}$  a  $10^{-5}$  M, ne mette in evidenza la forte tossicità.

Un esempio della citotossicità del superossido si ha con la veloce produzione di perossinitriti ( $\text{ONOO}^-$ ) nella reazione del superossido con l'ossido nitrico. Il perossinitrito, in equilibrio con il suo acido coniugato ( $\text{pK}_a \sim 6.8$ ), si comporta come un potente ossidante. In figura 3.1 è schematizzata la capacità della SOD di sequestrare il  $\text{O}_2^{\bullet-}$  riducendo così la possibilità che questo reagisca con le principali macromolecole dell'organismo.

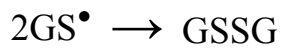
Se il radicale idrofilico  $\text{X}^{\bullet}$  è sequestrato da GSH in presenza di concentrazioni fisiologiche di ossigeno (20-50 mM), l'attività della superossido dismutasi sposta la seguente sequenza di reazioni verso destra:





**Figura 3.1:** ruolo della SOD come scavenger di specie reattive dell'ossigeno (Johnson et al., 2005).

Questa sequenza di reazioni by-passa la diretta ricombinazione di radicali GS<sup>•</sup>:

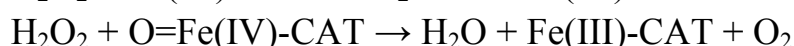
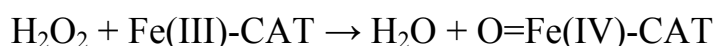


Tutto ciò potrebbe avere il vantaggio di prevenire reazioni collaterali indesiderate di GS<sup>•</sup> (Chaudiere et al., 1999).

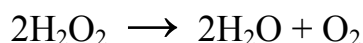


### 3.2.2 Catalasi

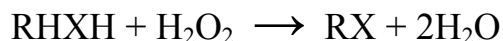
La CAT è un enzima tetramericico ad alto peso molecolare contenente porfirina. La funzione principale di questo enzima è quella di eliminare il perossido di idrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ad elevate concentrazioni catalizzando la sua dismutazione ad ossigeno e acqua attraverso una reazione che avviene in due passaggi:



La reazione netta risultante è quindi:



A basse concentrazioni di perossido di idrogeno l'enzima si comporta, invece, come una perossidasi utilizzando co-substrati riducenti come alcol, ascorbato e fenoli (*Kirkman et al., 1987*):



## 3.3 GLUTATIONE ED ENZIMI AD ESSO CORRELATI

Tra i più importanti sistemi antiossidanti endogeni possiamo citare il tripeptide glutatione e piccole proteine, come la tioredoxina, la glutaredoxina e la perossiredoxina, che hanno la particolarità di possedere nella loro struttura dei gruppi tiolici. Tra tutte queste molecole il glutatione si trova ubiquitariamente e in concentrazione millimolare all'interno della cellula ed apporta il maggior contributo nel mantenimento dello stato redox.

Il glutatione esiste sia in forma ridotta, il GSH, che ossidata, il GSSG, e partecipa alle reazioni redox attraverso l'ossidazione dei gruppi tiolici. Nelle normali condizioni redox cellulari la molecola si trova principalmente in forma ridotta ed è localizzata soprattutto nel nucleo, nel reticolo endoplasmatico e nei mitocondri; è possibile trovare anche

una forma legata covalentemente a proteine, attraverso un processo detto glutationilazione (*Huang et al., 2002a*), grazie al quale può agire come cofattore enzimatico in meccanismi di difesa cellulare (*Pompella et al., 2003*).

Il glutatione può agire direttamente nei confronti dei radicali liberi oppure può funzionare da substrato durante la detossificazione di idroperossidi lipidici, composti elettrofili ed acqua ossigenata.

Il glutatione è sintetizzato enzimaticamente dalla gamma-glutamylcisteina sintetasi ( $\gamma$ GCS), l'enzima chiave (*Lu, 1998*), e dalla glutatione sintetasi. Altri fattori importanti nella sintesi ex novo del GSH sono la stessa concentrazione di GSH che inibisce, attraverso un meccanismo a feed-back, l'attività della  $\gamma$ GCS e la disponibilità di cisteina (amminoacido fondamentale della molecola).

In presenza di stress ossidativo la concentrazione di GSSG, potenzialmente citotossico, aumenta a causa della avvenuta riduzione dei perossidi, oppure come risultato dell'eliminazione di radicali liberi, mentre quella di GSH diminuisce rapidamente. Queste variazioni del rapporto GSH/GSSG hanno come importanti conseguenze il fatto che lo stato redox dei tioli cellulari viene modificato, attivando alcune risposte trascrizionali antiossidanti, e che, poiché GSSG viene degradato preferenzialmente all'esterno della cellula, aumenta la richiesta intracellulare di sintesi ex novo di GSH.

Il meccanismo che si contrappone al danno ossidativo coinvolge la transattivazione di geni codificanti enzimi che partecipano alla sintesi ed al metabolismo del glutatione.

Nella maggior parte dei casi questi enzimi appartengono alla famiglia degli enzimi detossificanti di fase 1 e 2 e sono rappresentati dalla glutatione perossidasi (GPx), dalla glutatione S-transferasi (GST) e dalla glutatione reduttasi (GR).

Le GPx costituiscono una famiglia di enzimi tessuto-specifici (*Ursini et al., 1995*) in grado di ridurre numerosi idroperossidi organici ed inorganici ai corrispondenti composti idrossilati, utilizzando GSH e/o altri equivalenti riducenti.

Sono tutte proteine contenenti selenio, il quale, durante il ciclo catalitico, viene ossidato dall'idroperossido ad acido selenico, un intermedio che viene in seguito ridotto da un donatore di elettroni.

Quando l'enzima utilizza il GSH, si forma un ponte selenio-disolfuro che viene rotto da un'altra molecola di GSH per rigenerare la GPx ridotta.

Durante la catalisi, lo stato ossidativo dell'enzima dipende dalle concentrazioni relative del substrato ossidato, l'idroperossido, e del riducente, il GSH. Le glutatione perossidasi sono ubiquitarie.

Ad esempio, nel tratto gastrointestinale l'isoenzima forma una barriera nei confronti degli idroperossidi derivati dal metabolismo di xenobiotici tossici o dalla dieta. La GPx dei fosfolipidi sembra essere coinvolta nella protezione delle biomembrane contro il danno ossidativo.

In generale questi isoenzimi possono ricoprire un ruolo nel controllo dello stato redox di determinati distretti dell'organismo; in particolare sono coinvolti nella regolazione della concentrazione di idroperossidi e nell'evocazione di risposte cellulari quali, ad esempio, la morte programmata, la proliferazione e la produzione di citochine (*Nakashima et al., 2005*).

Le GST comprendono tre famiglie di enzimi: possono essere citosoliche, mitocondriali e microsomiali, e sono in grado di detossificare gli xenobiotici elettrofili nocivi, quali cancerogeni chimici ed inquinanti ambientali. Inoltre, rappresentano una protezione anche nei confronti di composti reattivi prodotti in vivo durante lo stress ossidativo dovuto all'ingestione di alimenti bruciati o contaminati da micotossine ed all'esposizione a sostanze inquinanti; agiscono inattivando chinoni, epossidi, aldeidi endogene insature ed idroperossidi (*Hayes et al., 2005*).

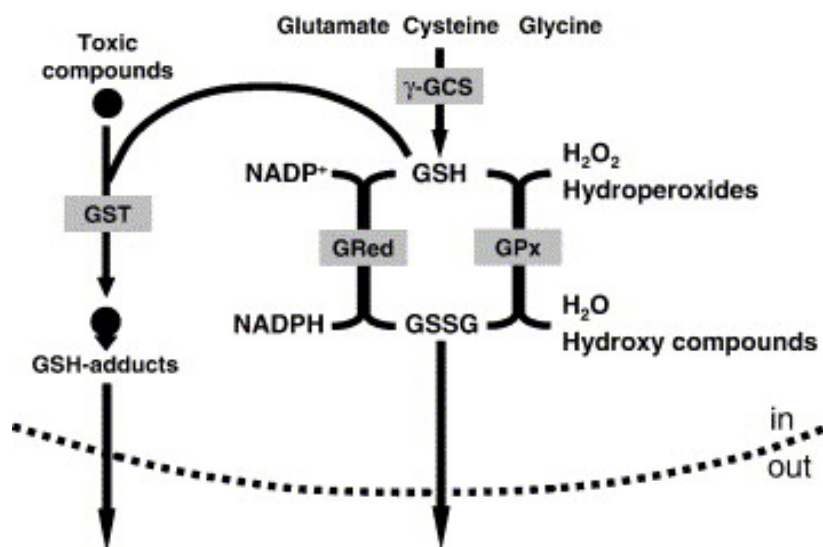
Le GST possiedono queste funzioni protettive perchè sono in grado di catalizzare la coniugazione del GSH con i prodotti finali dell'ossidazione, rappresentano perciò una seconda linea difensiva contro la numerosa varietà di sostanze tossiche prodotte nelle reazioni mediate dalle ROS.

Bisogna però sottolineare che GPx e GST possono abbassare i livelli di GSH intracellulare, infatti, durante la reazione catalizzata dalla GPx, l'esagerata produzione di GSSG può condurre ad un eccessivo rilascio di questa molecola per mantenere il rapporto GSH/GSSG, perdendo così la possibilità di rigenerarlo all'interno della cellula. Lo stesso accade durante le reazioni mediate dalle GST: in questo caso il GSH viene coniugato con le molecole dannose generando prodotti che sono rapidamente eliminati dalla cellula con conseguente deplezione del GSH cellulare.

La GR è in grado di ridurre il GSSG a GSH utilizzando il NADPH come agente riducente (*Argyrou et al., 2004*); è un flavoenzima codificato, negli uomini, da un gene singolo.

Si è osservato che l'esposizione ad agenti che provocano un aumento dello stress ossidativo produce anche uno stimolo positivo nella trascrizione dell'mRNA contenente l'informazione per la sintesi dell'enzima. È stato inoltre dimostrato che l'attività enzimatica è regolata in risposta allo stress e che mutazioni a carico della funzionalità di GR hanno effetti deleteri.

Possiamo quindi affermare che la ricostituzione di GSH è un passaggio fondamentale nel metabolismo delle reazioni GSH-dipendenti (*Rogers et al., 2004*). La presenza di GSH è importante per la funzionalità degli enzimi da esso dipendenti che partecipano ai meccanismi di difesa cellulari, ma non è, da sola, sufficiente a prevenire la citotossicità delle ROS. In figura 3.2 sono rappresentate le relazioni funzionali esistenti tra il glutatione e gli enzimi ad esso correlati.



**Figura 3.2: Glutathione ed enzimi ad esso correlati:** il glutathione può agire direttamente come scavenger di radicali liberi, oppure fungere da substrato per la glutathione perossidasi e la glutathione S-transferasi durante la detossificazione del perossido di idrogeno, dei lipidi idroperossidi e dei composti elettrofili. Durante le reazioni GST mediate, il GSH viene coniugato a diversi elettrofili, e gli addotti così formati vengono escreti dalla cellula. La produzione di GSSG attraverso la glutathione perossidasi può portare alla formazione di disolfuri misti, al rilascio del GSSG in eccesso per mantenere il rapporto GSH/GSSG, oppure alla riduzione a GSH attraverso la glutathione reduttasi utilizzando NADPH come agente riducente. La risultante deplezione del GSH cellulare può venire rimpiazzata da una sintesi ex novo attraverso due reazioni ATP dipendenti grazie alla  $\gamma$ GCS e alla glutathione sintetasi.

### 3.4 ENZIMI DETOSSIFICANTI DI FASE 2

#### 3.4.1 La tioredoxina reduttasi 1

I complessi della Trx e del GSH sono sistemi redox paralleli e sono accoppiati all'interno delle cellule. Tuttavia questi due sistemi sembrano condividere alcune funzioni. La diversa specificità di substrato e le proprietà caratteristiche di ciascuno dei due sistemi suggeriscono che essi possano contribuire in maniera sinergica a mantenere l'omeostasi redox cellulare (Aslund et al., 1999).

Il complesso della tioredoxina comprende la Trx, la TR e la tioredoxina perossidasi (TP). Trx è una proteina di piccole dimensioni con un peso molecolare di circa 12 kDa, caratterizzata da un ditiolo reattivo e da una sequenza conservata (Trp-Cys-Gly-Pro-Cys) (Holmgren, 1985).

La forma ridotta della Trx contiene un gruppo disolfuro con marcate capacità ossido riduttive che agisce ossidando le cisteine presenti nelle proteine e riducendo i disolfuri. A sua volta la Trx ossidata viene ridotta da TR in presenza di NADPH. TP riduce  $H_2O_2$  ad acqua ed ossigeno molecolare grazie ai due elettroni forniti da Trx (Wood *et al.*, 2003). TP sembra avere numerose funzioni, da antiossidante a regolatore dei segnali di trasduzione. Trx possiede attività intra ed extra cellulari. All'interno della cellula regola le interazioni tra proteine e acidi nucleici, svolge azione protettiva verso le ROS, regola le attività enzimatiche ed interagisce con le proteine. L'espressione della Trx è indotta nelle cellule in risposta ad una grande varietà di stimoli tra cui il perossido di idrogeno, i raggi X, le radiazioni ultraviolette, le mutazioni genetiche e le infezioni virali (Tomimoto *et al.*, 1993). D'altra parte Trx è rapidamente secreta o rilasciata da svariati tipi di cellule, tra cui cellule transfettate con il plasmide contenente il gene Trx (Gallegos *et al.*, 1996). Lo stress ossidativo è uno dei fattori che promuovono la secrezione di Trx (Rubartelli *et al.*, 1992).

La Trx extracellulare ha un ruolo nella regolazione delle citochine (Bertini *et al.*, 1999; Newman *et al.*, 1994) e nella stimolazione della crescita cellulare (Gasdaska *et al.*, 1995).

Sebbene il meccanismo attraverso il quale la Trx extracellulare agisce sia stato ampiamente studiato, molte delle proprietà dell'enzima non sono ancora totalmente chiarite. E' noto che la stessa Trx è resistente all'ossidazione ed è stata perciò largamente utilizzata per ridurre lo stress ossidativo in cellule epiteliali (Spector *et al.*, 1988); Trx può rappresentare un messaggero per l'induzione di numerosi segnali di trasduzione, inclusi quelli necessari agli antiossidanti per combattere lo stress ossidativo.

### 3.4.2 La NADP(H): chinone ossidoreduttasi 1

La NAD(P)H: chinone ossidoreduttasi 1 (NQO1) è una flavoproteina che esiste come dimero, le cui subunità hanno peso molecolare di 32 kDa; è generalmente associata ad un gruppo FAD legato non covalentemente. Si trova prevalentemente nel citosol (90%) (*Eliasson et al., 1999*), nonostante siano state individuate isoforme anche nel reticolo endoplasmatico, nell'apparato del Golgi (*Edlund et al., 1982*) nei mitocondri e nel nucleo (*Winski et al., 2002*).

Questo enzima è una reduttasi che utilizza obbligatoriamente due elettroni nelle sue reazioni. Ciò è in contrasto con il meccanismo di altre reduttasi come la NADH: citocromo b reduttasi, la NADPH: citocromo P450 e la xantina ossidasi, che utilizzano invece un solo elettrone. Il meccanismo cinetico è definito a “ping-pong” ed utilizza i cofattori NADPH e NADH indifferentemente (*Siegel et al., 1990*).

Come suggerito dal nome dell'enzima, i chinoni sono un gruppo di substrati molto comuni e vengono ridotti con un meccanismo di trasferimento di ioni idruro per generare il corrispondente derivato idrochinonico.

Per via dei numerosi effetti deleteri dei composti chinonici, come la capacità di arilare i nucleofili e generare specie reattive dell'ossigeno attraverso meccanismi redox ciclici, la rimozione di un chinone da un sistema biologico attraverso la NQO1 viene considerata una reazione di detossificazione (*Di Monte et al., 1984; Lind et al., 1982*). Tuttavia la riduzione attraverso due elettroni di alcuni chinoni antitumorali come mitomicina C, streptonigrina, E09 e B-lapachone attraverso NQO1, produce metaboliti di tossicità superiore rispetto ai composti di partenza (*Beall et al., 1996; Pink et al., 2000*). Poiché la NQO1 è contenuta ad elevate concentrazioni in tutte le cellule di tumore solido umano (*Siegel et al., 2000*), si è pensato di utilizzare i composti bioattivati dalla stessa NQO1 nella terapia di tali tumori (*Winski et al., 2001*).

### ***3.4.3 Detossificazione dei chinoni attraverso la riduzione a due elettroni***

Numerosi studi attestano il ruolo della NQO1 nei sistemi di detossificazione. L'induzione di questo enzima sembra proteggere dagli effetti citotossici, mutageni e cancerogeni di diversi composti (Talalay *et al.*, 1982).

In uno studio condotto a Stoccolma negli anni '80 due differenti gruppi di ricerca, utilizzando il naftochinone menadione (Lind *et al.*, 1982; Thor *et al.*, 1982), hanno evidenziato il ruolo della NQO1 come enzima detossificante nel metabolismo dei chinoni. Sia la formazione di specie reattive dell'ossigeno, sia l'arilazione menadione-indotta dei nucleofili cellulari, diminuiscono in presenza di NQO1. In topi carenti di NQO1 è stata dimostrata la tossicità del menadione ed un aumento dell'insorgenza di tumori della pelle indotti da benzo[a]pirene e 7,12-dimetilbenzantracene (Long *et al.*, 2001). Recenti studi effettuati utilizzando il t-butilidrochinone, una comune molecola che aumenta i livelli di NQO1, mostrano l'incremento dell'espressione di 63 diversi geni attraverso l'uso della tecnologia dei microarray (Li *et al.*, 2002). Tutto questo dimostra il bisogno di mettere a punto studi mirati a definire il ruolo di un particolare gene nei meccanismi di detossificazione.

Il ruolo della NQO1 nei meccanismi di detossificazione è correlato alla sua distribuzione nei sistemi biologici, infatti nei ratti, nei topi ed anche negli uomini si ritrova principalmente nei tessuti endoteliali ed epiteliali (Siegel *et al.*, 2000), il che facilita l'interazione dei composti introdotti nell'organismo con la NQO1.

### ***3.4.4 NQO1 come enzima antiossidante: ruolo nel metabolismo dell'ubichinone e della vitamina E***

Oltre ad essere in grado di attivare e disattivare i composti esogeni, NQO1 ha un importante ruolo anche nel metabolismo di chinoni endogeni quali la vitamina E e l'ubichinone. Questi chinoni



possiedono una grande porzione idrofobica e, nel loro stato ridotto, proteggono le membrane cellulari dalla perossidazione lipidica.

La riduzione dell'ubichinone ad opera della NQO1 rigenera l'ubichinolo, che possiede forti proprietà antiossidanti (*Landi et al., 1997*). Il chinone vitamina E si forma durante l'attacco del radicale libero alla vitamina E ed è sottoposto alla riduzione da parte di NQO1 per generare l'idrochinone (*Siegel et al., 1997*). Poiché il chinone vitamina E è privo di attività antiossidante, NQO1 può generare l'idrochinone corrispondente, un composto con proprietà antiossidanti superiori alla vitamina E (*Kohar et al., 1995*).



---

## **4 LA VIA DI SEGNALEZIONE NRF2-ARE**

---

### **4.1 INDUZIONE DEGLI ENZIMI CITOPROTETTIVI**

Le cellule dei diversi tessuti dell'organismo sono costantemente esposte all'azione tossica e potenzialmente mutagena di una serie di agenti ossidanti costituiti da specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS), metaboliti elettrofili e prodotti della lipoperossidazione, generati endogenamente o da composti esogeni che costituiscono diversi fattori di stress ambientale (aria, acqua, cibo, etc.). Elevati livelli di specie "reattive" alterano la normale funzionalità cellulare interagendo direttamente con le macromolecole (proteine, lipidi, DNA nucleare e mitocondriale) che costituiscono le strutture cellulari, o indirettamente innescando una ulteriore produzione e propagazione di un sempre maggior numero di molecole reattive ed il risultato finale di questa cascata di reazioni è una disfunzione e/o la morte cellulare.

Per contenere o attenuare l'insulto ossidativo, si è sviluppato negli organismi superiori un sistema di difesa antiossidante, la cui induzione rappresenta non solo una risposta adattativa alla condizione di stress ossidativo, ma anche una nuova possibilità terapeutica (*Giudice et al., 2006; Lee et al., 2005*).

Questo sistema di difesa è rappresentato non solo da enzimi antiossidanti, ma anche da enzimi che regolano lo stato redox dell'ambiente cellulare come la glucosio 6-fosfato deidrogenasi, la glutathione reduttasi (GR) e la tioredoxina reduttasi (TR) che rigenerano rispettivamente NADPH, il glutathione (GSH) e la tioredoxina (Trx), la gamma-glutamylcisteina sintasi ( $\gamma$ -GCS) che catalizza la tappa limitante della biosintesi del glutathione, da enzimi di riparazione del DNA, da proteine del sistema di degradazione del proteasoma, chaperones e stress proteins, nonché da enzimi di fase 2

del metabolismo degli xenobiotici che includono la NAD(P)H:chinone ossidoreduttasi (NQO1) e la glutatione-S-transferasi (GST), la UDP-glucuronosil transferasi (UGT), l'aldeide reduttasi (AR), epossido idrolasi (EH) che conducono alla detossificazione e all'eliminazione dei carcinogeni e l'eme ossigenasi (HO).

Benchè gli enzimi di fase 2 siano tradizionalmente identificati come aventi una azione detossificante di substrati endo e xenobiotici, questa classificazione si sta espandendo fino ad includere proteine che catalizzano un ampio spettro di reazioni che conferiscono citoprotezione contro la tossicità di elettrofili e specie reattive dell'ossigeno.

Questi enzimi proteggono la cellula contro la tossicità delle specie reattive (e dei potenziali cancerogeni) attraverso una varietà di reazioni tra cui le principali sono rappresentate dalla conversione a specie meno reattive e meno tossiche mediante coniugazione con substrati endogeni tra cui glutatione, acido glucuronico o il solfato che aumentano la solubilità della molecola e ne facilitano così l'escrezione e dall'aumento della capacità antiossidante cellulare attraverso la generazione di antiossidanti endogeni quali, ad esempio, GSH e bilirubina (Talalay, 2000).

L'induzione di tali enzimi risulta in una detossificazione ed eliminazione sia di potenziali cancerogeni che di specie reattive dell'ossigeno prodotte da fonti endogene, composti elettrofili e ossidati con conseguente protezione delle strutture cellulari bersaglio della loro tossicità. La conseguenza principale di tale induzione sarebbe quindi un rafforzamento della capacità antiossidante cellulare. La up-regolazione del sistema antiossidante endogeno rappresenta quindi potenzialmente una strategia per la riduzione del rischio di patologie, in particolare quelle cronico degenerative, in cui lo stress ossidativo rappresenta un fattore causale (Nguyen et al., 2003b; Sheweita et al., 2003; Talalay, 1989).

#### **4.1.1 Antioxidant Responsive Element (ARE) e ARE induttori**

L'induzione di molti enzimi citoprotettivi in risposta ad uno "stress chimico" è regolato principalmente a livello trascrizionale. Questa risposta coordinata è regolata attraverso l'Antioxidant Response Element o ARE, una sequenza enhancer presente nella regione del promotore di numerosi geni che codificano per enzimi citoprotettivi (*Friling et al., 1990; Li et al., 1992; Rushmore et al., 1991a*). La sequenza ARE possiede caratteristiche strutturali e biologiche che caratterizzano la sua responsività allo stress ossidativo; è infatti attivata non solo in risposta ad  $H_2O_2$ , ma in modo specifico da composti chimici suscettibili di cicli ossidoriduttivi o di essere trasformati in un intermedio elettrofilo reattivo. Alterazioni dello stato redox cellulare dovute ad elevati livelli di specie reattive ROS e specie elettrofile e/o una ridotta capacità antiossidante (es. glutathione) rappresentano importanti segnali per l'innescare della risposta trascrizionale mediata da questo enhancer.

ARE viene attivato da numerose molecole strutturalmente diverse, tra cui composti planari come i flavonoidi e gli antiossidanti fenolici (*Rushmore et al., 1991b*), composti contenenti gruppi tiolici come gli isotiocianati (*Talalay et al., 1995*) e gli 1,2-ditiol-3-tioni (*Kwak et al., 2001*), metalli pesanti (*Prester et al., 1995*) e complessi contenenti il gruppo eme (*Inamdar et al., 1996*).

Le caratteristiche salienti di questi composti hanno permesso di categorizzarli in due gruppi principali: induttori mono e bi-funzionali. Gli induttori monofunzionali, benché strutturalmente molto dissimili, hanno in comune alcune proprietà: sono composti elettrofili, reagiscono con i gruppi sulfidrilici attraverso reazioni di ossidazione, riduzione, alchilazione, partecipano a reazioni di ossido-riduzione ed alcuni sono anche substrati della GST che promuove la loro coniugazione con GSH (*Dinkova-Kostova et al., 2001*). Gli induttori bifunzionali invece acquistano tali proprietà in seguito al metabolismo ossidativo.

Un classico induttore bifunzionale è  $\beta$ -NF, un flavonoide sintetico che, dopo metabolismo ad opera del CYP 1A1 ad intermedio chinone, può partecipare nella cellula a cicli redox (*Rushmore et al., 1990*).

Composti come gli isotiocianati ed il dietilmaleato non necessitano di metabolismo e possono reagire direttamente con i gruppi SH, ossidare i residui di cisteina e consumare il GSH cellulare, mimando così un insulto ossidativo.

I composti che inducono l'espressione di enzimi citoprotettivi in modo ARE dipendente sono complessivamente chiamati ARE induttori; essi costituiscono un ampio gruppo di sostanze in grado di aumentare la capacità antiossidante cellulare con un meccanismo che può essere considerato di tipo antiossidante indiretto. Tali proprietà sono condivise da alimenti di origine vegetale di regolare consumo e da altri prodotti naturali (*Eggler et al., 2008; Surh et al., 2008*) che sono attualmente ampiamente investigati in virtù della loro relativamente bassa tossicità, ampia disponibilità, nonché per loro implicazioni come alimenti salutistici o funzionali (tabella 1). Il successo nell'uso di prodotti naturali per up-regolare gli enzimi citoprotettivi nell'uomo è strettamente dipendente dalla conoscenza dei meccanismi molecolari che regolano questa up-regolazione.

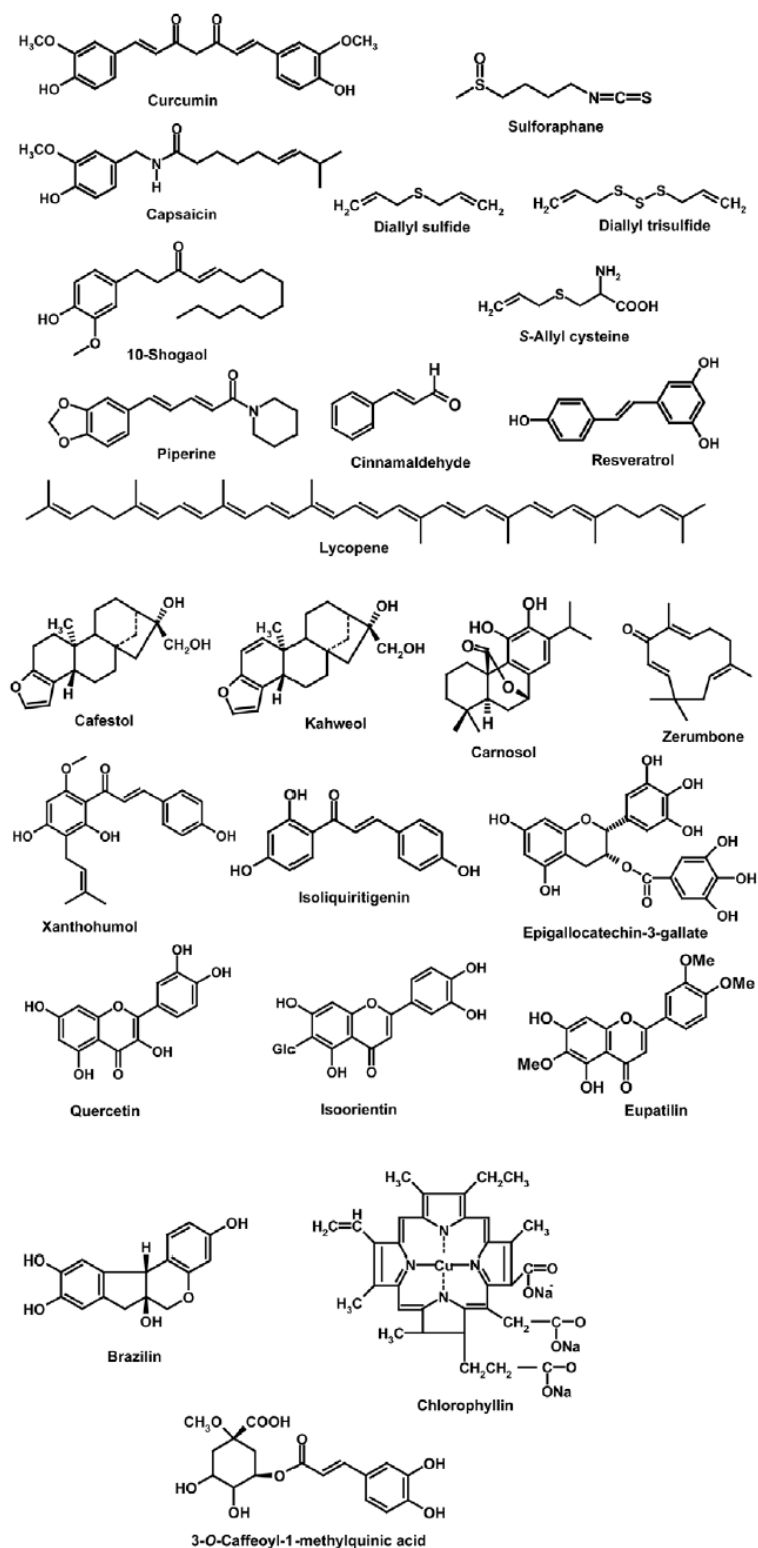


Tabella 1: ARE induttori (Surh et al., 2008)

#### **4.1.2 La via di segnalazione ARE-mediata e i meccanismi di difesa: ruolo della proteina Nrf2**

Un ruolo centrale nella modulazione della risposta trascrizionale ARE mediata è rivestito dal fattore di trascrizione nucleare, “Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2” (Nrf2) che è un fattore di trascrizione di tipo leucina zipper, isolato inizialmente attraverso esperimenti di clonazione (Moi *et al.*, 1994).

La proteina NF-E2 attiva la trascrizione in seguito al legame con la sequenza 5'-TGCTGAGTCAC-3' sul DNA, formando un eterodimero con subunità di 45 e 18 kDa (Igarashi *et al.*, 1994). La subunità p45 è una proteina bZIP contenente il dominio di transattivazione nella regione N-terminale, mentre nella regione C-terminale vi è una sequenza con struttura leucina zipper (Ney *et al.*, 1993). La subunità p18 è stata identificata successivamente come appartenente alle proteine Maf, contenente la struttura di legame al DNA leucina zipper, ma priva del dominio di transattivazione. Mentre l'espressione della subunità p45 di NF-E2 è caratteristica dei tessuti ematopoietici (Ney *et al.*, 1993), altri due componenti della famiglia bZIP, quali Nrf1 e Nrf2, sono espressi ubiquitariamente in cellule e tessuti (McMahon *et al.*, 2001).

La distribuzione tissutale di queste proteine, combinata con la loro sequenza per il legame al DNA simile a quello di ARE, ha fatto ipotizzare che i geni collegati ad ARE siano regolati da Nrf1 e/o Nrf2. Successivamente al suo isolamento, Nrf2 è stato identificato come uno dei fattori di trascrizione che agiscono sulla sequenza ARE della NQO1 umana, per attivarne la trascrizione genica, in cellule transfettate in modo transiente (Venugopal *et al.*, 1996). Osservazioni simili sono state fatte successivamente per la sequenza ARE di numerosi altri geni (Nguyen *et al.*, 2003b).

Il ruolo critico di Nrf2 nell'espressione dei geni di fase 2 ed antiossidanti è stata ulteriormente confermata da studi di espressione genica in topi che non esprimono Nrf2; confrontati a topi wild-type mostravano ridotti livelli di enzimi antiossidanti ed una maggiore



sensibilità ai carcinogeni (*Lee et al., 2005; Ramos-Gomez et al., 2001*).

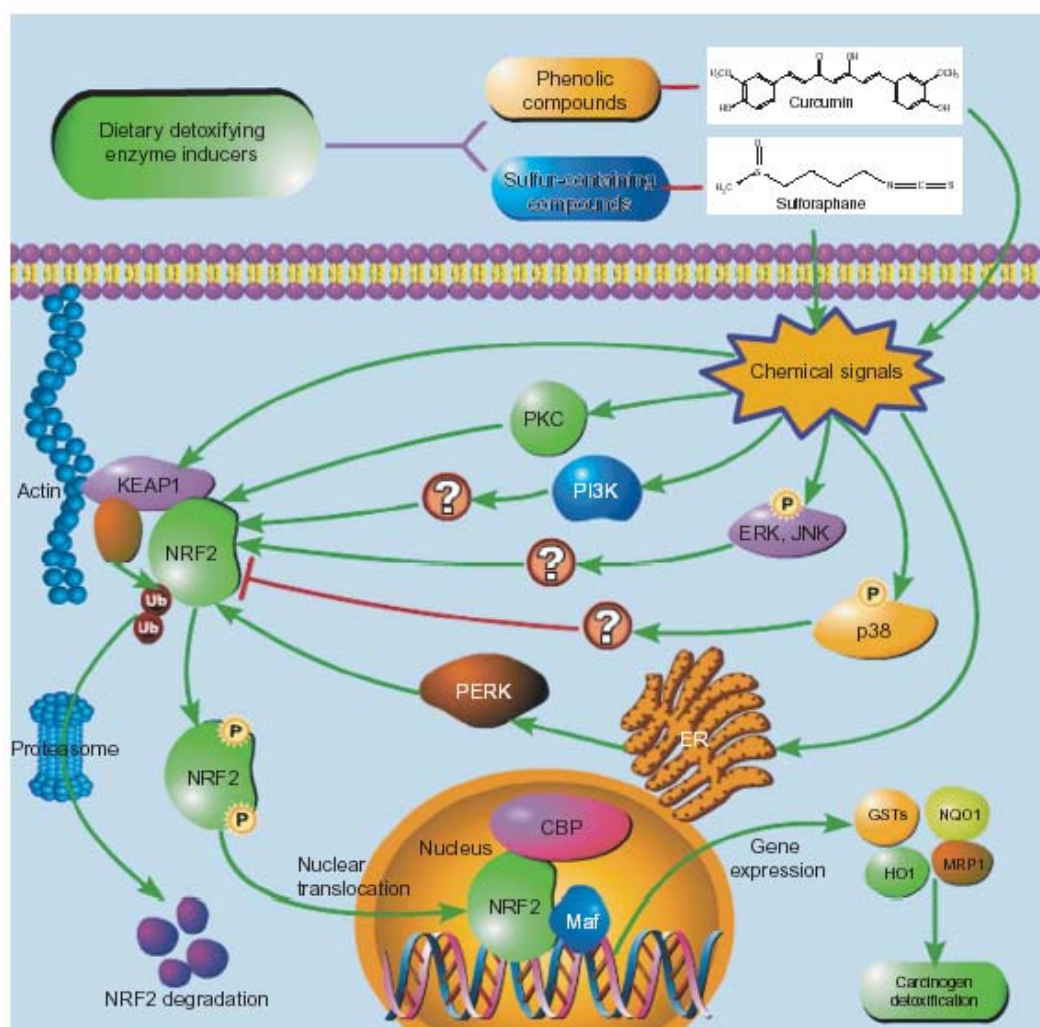
Il coinvolgimento di Nrf2 nell'espressione sia costitutiva, sia inducibile dei geni "ARE-dipendenti", è ben stabilita e documentata in numerosi studi sia in vitro che in vivo (*Nguyen et al., 2004*), tanto che attualmente il sistema Nrf2/ARE è riconosciuto come uno dei principali meccanismi di difesa cellulare contro stress ossidativo e xenobiotico.

Aumentati livelli di Nrf2 sono stati riportati up-regolare l'espressione genica indotta da vari antiossidanti naturali ed agenti chemio preventivi quali isotiocianati, solfuri diallilici, indoli, terpeni, e composti fenolici come le catechine del té verde, la quercetina, il resveratrolo e i curcuminoidi (*Surh et al., 2008*).

In aggiunta ai classici enzimi di fase 2, due geni che codificano per trasportatori cellulari sono stati scoperti essere sotto il controllo regolatorio di Nrf2: uno è il gene che codifica per il trasportatore cisteina-glutammato che media l'influsso di cisteina accoppiato con l'efflusso di glutammato intracellulare (*Sasaki et al., 2002*), essenziale per il mantenimento delle concentrazioni intracellulari di cisteina e conseguentemente dei livelli di glutatione; l'altro è il gene Mrp1, un membro della famiglia Multidrug-resistance-associated proteins (*Hayashi et al., 2003*) un trasportatore che ha un ruolo importante nell'esclusione cellulare dei metaboliti coniugati degli enzimi di fase 2.

Due proteine partecipano all'attivazione trascrizionale dei geni ARE-dipendenti: il fattore di trascrizione Nrf2 e la proteina Keap1 (kelch-like erythroid-cell-derived protein with CNC homology (ECH)-associated protein 1), una proteina citoplasmatica omologa alla proteina legante l'actina Kelch identificata nella *Drosophila* (*Itoh et al., 1999b*). Queste costituiscono, a livello citoplasmatico, un sistema sensore dello stress ossidativo, che costituisce il target molecolare primario degli induttori chimici e dei composti ad azione chemiopreventiva (*Talalay et al., 2003; Wolf, 2001*). Quando le cellule sono esposte ad ARE induttori, quali ad esempio, ditioltioni,

flavonoidi, isotiocianati, o a stress ossidativo, un segnale che coinvolge una modificazione redox e/o una fosforilazione è trasmesso al complesso Nrf2/Keap1, causandone la dissociazione e la conseguente traslocazione nucleare di Nrf2 (figura 4.1). In seguito alla formazione di un eterodimero, Nrf2 è in grado di legarsi alla sequenza ARE presente nella regione del promotore dei geni che codificano per gli enzimi di fase 2 aumentandone la trascrizione ed aumentando anche la sua stessa trascrizione (Kwak *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2003b)



**Figura 4.1:** La via di segnalazione Nrf2-Keap1-ARE (Chen *et al.*, 2005)

#### **4.1.3 Regolazione della attività trascrizionale di ARE: il sistema Nrf2-Keap1**

Studi approfonditi hanno indagato il meccanismo regolatorio coinvolto nella via di segnalazione Nrf2/ARE.

La proteina “Kelch-like ECH associated protein 1” (Keap 1), legata all’actina citoscheletrica, è stata recentemente identificata come regolatore chiave dell’attività di Nrf2 (*Itoh et al., 1999b*), non solo agendo come sensore di stress ossidativo, ma anche regolandone la localizzazione intracellulare tra citoplasma e nucleo e la degradazione da parte del proteasoma (*Itoh et al., 2003; McMahon et al., 2003; Zhang et al., 2003*)

In condizioni basali Keap1 lega saldamente Nrf2 mantenendolo sequestrato a livello citoplasmatico (*Kang et al., 2004*) reprimendo, in questo modo, la sua abilità di indurre geni di fase 2; questa repressione è particolarmente importante nell’evitare una attivazione genica non necessaria in assenza di uno stimolo stressorio.

Keap 1 è una proteina ricca di residui cisteinici, alcuni dei quali svolgono il ruolo di sensori di stress ossidativo o di composti xenobiotici (*Motohashi et al., 2004*). In particolare, le cisteine C257, C273, C288 e C297 sono responsabili dell’interazione con Nrf2, come dimostrato dal fatto che mutazioni a carico di questi residui (in particolare C273 e C288) aboliscono l’effetto repressivo di Keap1 suggerendo un ruolo chiave di queste due cisteine nella repressione di Nrf2. Composti elettrofili, gli induttori chimici e lo stress ossidativo agiscono attraverso una modificazione dei tioli dei residui cisteinici di Keap 1 che rilascia Nrf2 permettendone la traslocazione al nucleo (*Wakabayashi et al., 2004*).

Un altro importante ruolo di Keap 1 è la capacità di regolare la degradazione di Nrf2. In condizioni basali Nrf2 ha un’emivita molto breve (13–20 minuti, approssimativamente in dipendenza dal tipo cellulare), e tale instabilità è stata attribuita ad una costitutiva ubiquitinazione e degradazione da parte del proteasoma (*Nguyen et al., 2003b; Zhang et al., 2003*). La stretta interazione tra Keap 1 ed

Nrf2 faciliterebbe l'ubiquitinazione e degradazione da parte del proteasoma. Keap1 si associa con la protein Cullin 3 (Cul3) per formare un complesso funzionale ubiquitina ligasi E3 che ha come bersaglio la porzione N-terminale di Nrf2, fungendo in questo modo da adattatore e regolando i livelli basali di Nrf2 (*Zhang et al., 2004*).

Keap1 risulta quindi agire come regolatore negativo di Nrf2 aumentando la sua degradazione da parte del proteasoma ed impedendone conseguentemente l'accumulo a livello nucleare (*McMahon et al., 2003*). Infatti, un livello stabile di Nrf2 sembra essere mantenuto da un preciso equilibrio tra i suoi livelli di sintesi e di degradazione da parte del proteasoma. In risposta allo stress ossidativo, è stato ipotizzato che Nrf2 continuerebbe ad essere sintetizzato ma la sua degradazione diminuirebbe, così che il bilancio si sposti in favore di un suo accumulo portando infine ad una aumentata attività trascrizionale (*Nguyen et al., 2003a*).

La difficile spiegazione di come, applicando un modello corrente del sequestro di Nrf2 da parte di Keap1, sia mantenuta la trascrizione costitutiva degli enzimi di fase 2, ha portato recentemente i ricercatori a ipotizzare modelli alternativi della via di segnalazione mediata da Nrf2. Una di queste ipotesi identifica Nrf2 come una proteina nucleare (*Pickett et al., 2009*).

In questo modello una eccessiva trascrizione ARE mediata è prevenuta da un continuo movimento di Keap1 dentro e fuori dal nucleo per la rimozione di Nrf2 e il suo trasporto al citoplasma dove viene degradato dal proteasoma. Questo shuttling sarebbe bloccato in situazioni di stress ossidativo e da composti che agiscono come ARE induttori, permettendo così l'accumulo di Nrf2 e l'aumento della trascrizione genica. Le spiegazioni di tipo meccanicistico per comprendere tali distruzione dell'interazione tra Keap1 e Nrf2 sono limitate ma è possibile ipotizzare che possano essere coinvolti degli eventi simili a quelli coinvolti nel modello corrente.

La via di trasduzione del segnale Nrf2-Keap1-ARE può essere modulata da molte chinasi a monte, incluse la fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K), la proteina chinasi C e le proteine chinasi mitogeno-

attivate (MAPKs). Fosforilazioni di Nrf2 a livello di residui di serina e treonina possono influenzare il processo di liberazione di Nrf2, la sua traslocazione al nucleo e la sua stabilizzazione.

Le evidenze sperimentali indicano che sia la proteina chinasi regolata da segnale extracellulare ERK, che la chinasi c-jun N-terminale (JNK) hanno una influenza positiva sull'attivazione ARE mediata (*Keum et al., 2003; Yu et al., 1999*), mentre la chinasi p38 regolerebbe negativamente ARE (*Yu et al., 2000*), anche se la risposta può variare a seconda del tipo cellulare. Anche se non è stato ancora completamente chiarito se Nrf2 rappresenta un substrato diretto della fosforilazione operata dalle MAPK, è stato dimostrato che l'inibizione selettiva di queste vie, prima del trattamento con induttori chimici degli enzimi detossificanti, riduce la traslocazione nucleare e l'accumulo a livello nucleare della proteina Nrf2 (*Kong et al., 2001; Owuor et al., 2002; Zipper et al., 2003*). Inoltre, le MAPK possono influenzare la funzione di Nrf2 mediante la fosforilazione di proteine che agiscono come coattivatori della trascrizione, quali cAMP response element-binding protein (CREB)-binding protein (CBP) (*Shen et al., 2004*).

Il potenziale ruolo di PKC nella regolazione di Nrf2/ARE è stato suggerito dall'osservazione che l'utilizzo di un inibitore specifico era in grado di bloccare la attivazione di Nrf2 in risposta ad antiossidanti quali *tert*-butilidrochinone (tBHQ) (*Huang et al., 2000*), successivamente la Ser40 è stata individuata come sito specifico della fosforilazione (*Huang et al., 2002b*). La fosforilazione di questo residuo è richiesta per il rilascio di Nrf2 da parte di Keap 1 ma non per la stabilizzazione del fattore di trascrizione, il suo accumulo e per l'attivazione di ARE (*Bloom et al., 2003*).

La funzione di PI3K è stata individuata osservando che gli inibitori specifici di questa via diminuiscono sia la capacità di legame alla sequenza ARE sia l'induzione di NQO1 e GSTA2 (*Kang et al., 2003; Nakaso et al., 2003*), tuttavia non esistono prove che l'attivazione di tale via porti ad una fosforilazione diretta di Nrf2. E' stato ipotizzato che l'attivazione di tale via da parte di antiossidanti o dello stress

ossidativo sia il risultato di una depolimerizzazione dei filamenti di actina, che facilita la traslocazione di Nrf2 al nucleo (Kang *et al.*, 2002).

E' stato recentemente dimostrato che Nrf2 rappresenta un substrato di fosforilazione della PERK kinasi, una proteina chinasi che deriva dal reticolo endoplasmatico, che attraverso questa via attiverebbe un meccanismo citoprotettivo in risposta allo stress che interessa il reticolo endoplasmatico (ER stress) (Cullinan *et al.*, 2004).

Una possibile spiegazione della convergenza di così tante vie di trasduzione sul "trascrittoma" ARE/Nrf2 potrebbe risiedere nel fatto che differenti tessuti e/o tipi cellulari possono esprimere diversi livelli di queste proteine segnale per far fronte a diversi tipi di stress endogeno o esogeno. Per questa ragione è logico che non tutti questi segnali siano attivi contemporaneamente all'interno di un tessuto e che queste vi potrebbero essere attivate in sequenza o il parallelo come risultato di un cross talk di queste prioteine con il risultato finale di una regolazione fine della trascrizione mediata da ARE/Nrf2.

Va inoltre sottolineato oltre al loro contributo all'induzione degli enzimi detossificanti, MAPK, PKC, PI3K e PERK sono ampiamente coinvolte nella sopravvivenza e proliferazione cellulare.

#### **4.1.4 Ruolo del sulforafane nella via mediata da Keap1-Nrf2**

SF è un potente induttore dell'accumulo nucleare di Nrf2 nelle cellule (Jakubikova *et al.*, 2006). L'esposizione ad SF consente a Nrf2 di sottrarsi alla degradazione dipendente da Keap1, aumentando così la sua localizzazione nucleare e l'attivazione di geni Nrf2-dipendenti (Jeong *et al.*, 2006; McMahon *et al.*, 2003).

SF è un composto elettrofilo che può reagire con tioli proteici per formare addotti tioloacilici ed esibisce un pattern di modificazioni su Keap1 nettamente diverso dagli induttori di ARE, che agiscono mediante alchilazioni.

Il trattamento in vivo con SF non porta ad un accumulo di Keap1 ubiquinata (Hong *et al.*, 2005) come è stato recentemente riportato in vitro (Zhang *et al.*, 2005) suggerendo un nuovo meccanismo per la

stabilizzazione di Nrf2 con la formazione di addotti tionoacilici tra Keap1 e SF (*Hong et al., 2005*).

Nonostante il modello in cui Keap1 lega Nrf2 sembri spiegare con successo la repressione e l'attivazione di Nrf2 in risposta al cambiamento delle condizioni redox, sono state riportate alcune considerazioni contrastanti. È stato dimostrato che la sola modificazione elettrofila di Keap1 non è sufficiente a rompere il complesso Keap1-Nrf2 (*Eggler et al., 2005*) e che tale complesso può essere perturbato attraverso la non-espressione di Keap1 mediante siRNA (*Devling et al., 2005*). Negli epatociti di topo la delezione del gene di Keap1 ha attivato Nrf2 e ne ha aumentato il suo accumulo nel nucleo portando ad una sovraespressione di molti enzimi di fase 2 (*Okawa et al., 2006*). Ciononostante studi successivi hanno chiarito che Nrf2 è in grado da solo di rilevare e trasdurre segnali ossidativi nel nucleo e di conseguenza di iniziare la trascrizione di geni che codificano per gli antiossidanti (*Li et al., 2006a*). Tuttavia Keap1 può fornire un'ulteriore regolazione delle quantità di Nrf2 sia in condizioni basali che inducibili.

La via di trasduzione del segnale Nrf2-Keap1-ARE può essere modulata da molte chinasi a monte, incluse la fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K), la proteina chinasi C e le proteine chinasi mitogeno-attivate (MAPKs).

SF ed il suo analogo erucina, aumentano i livelli di mRNA di NQO1, UGT1A1 e MRP2 in cellule Caco2 mediante l'attivazione di ERK e di AKT (*Jakubikova et al., 2005*). Il coinvolgimento di ERK e JNK nell'aumento dell'attività trascrizione di ARE indotto da SF è stato dimostrato anche in cheratinociti murini (*Manandhar et al., 2007*). In maniera opposta sembra operare il segnale mediato da p38, il cui sito di fosforilazione sembra essere differente da quello delle altre chinasi. L'overespressione di p38 causa un aumento della interazione tra Nrf2 e Keap 1 ed attenua la traslocazione, costitutiva ed inducibile, di Nrf2 al nucleo, mentre la down regolazione di p38 è responsabile dell'induzione di HO-1 in cellule Hep G2 in seguito a trattamento con SF (*Keum et al., 2006*). È stata scoperta di recente la capacità di SF di

indurre geni regolati da Nrf2 con meccanismo PI3K-dipendente (Wang *et al.*, 2008).

Il ruolo chemiopreventivo di Nrf2 è sottolineato dall'aumentata suscettibilità ai composti cancerogeni e dalla perdita della capacità chemioprotettiva di SF che si verificano nei topi privi di Nrf2.

Nei topi ICR, SF ha ostacolato lo sviluppo di tumori provocati da BaP nella parte anteriore dello stomaco, mediante l'attivazione di enzimi antiossidanti e detossificanti di fase 2, ma tale protezione è risultata assente nei topi privi del gene codificante per Nrf2 (Fahey *et al.*, 2002). Tali topi sono risultati più sensibili allo sviluppo di tumori cutanei, suggerendo che gli effetti chemiopreventivi di SF in tale tessuto siano modulati e necessitino del fattore Nrf2 (Xu *et al.*, 2006).

Inoltre topi con il gene Nrf2 non funzionante hanno manifestato minor capacità di indurre enzimi detossificanti, quali la GST e la NQO1 e maggiore suscettibilità all'azione di composti elettrofili citotossici (McMahon *et al.*, 2001).

La somministrazione dietetica di semi di broccolo a topi Nrf2 (+/+) e Nrf2 (-/-) ha incrementato l'attività di NQO1 e GST di circa 1.5 volte nel fegato, nello stomaco e nell'intestino di animali con fenotipo normale, ma non in quelli mutati.

La maggior attività transferasica è associata ad elevati livelli delle isoforme GSTA1/2, GSTA3 e GSTEM1/2. Gli estratti di semi di broccoli hanno significativamente aumentato anche i livelli degli enzimi GSTA3, GSTM1 e NQO1 nei fibroblasti embrionali dei topi Nrf (+/+) (McWalter *et al.*, 2004), confermando ulteriormente che, sia in vivo che in vitro, l'azione antiossidante e detossificante di SF, attraverso l'induzione enzimatica, dipende dal fattore Nrf2.

A livello molecolare sono stati scoperti numerosi geni Nrf2-dipendenti che possono essere indotti da SF (McWalter *et al.*, 2004). Analisi dei profili di espressione genica, che si sono avvalse della serie oligonucleotidica U74Av2 del genoma murino, hanno identificato 26 geni Nrf2-dipendenti, geni inducibili da SF e, tra questi, geni che codificano per enzimi metabolizzanti xenobiotici come NQO1, GST,



GCS e per enzimi biosintetici del glutatione (*Thimmulappa et al.*, 2002).

Questi studi hanno evidenziato che fra i prodotti dei geni indotti da SF attraverso la via Nrf2-dipendente sono compresi enzimi metabolizzanti xenobiotici, antiossidanti, proteine che regolano l'adesione, la crescita e il ciclo cellulare, chinasi, fosfatasi, proteine di trasporto e fattori di trascrizione. Nrf2 oltre a mediare la trascrizione dei geni di fase 2 può regolare l'espressione dei trasportatori di fase 3 (*Hu et al.*, 2006).

#### **4.1.5 Induzione degli enzimi di fase 2 mediata dal sulforafane**

SF si è dimostrato il più potente induttore naturale degli enzimi di fase 2 sia negli animali che nell'uomo (*Talalay*, 2000), dove c'è una relazione inversa fra il livello di enzimi presenti e la suscettibilità ai composti cancerogeni (*Kwak et al.*, 2001).

Gli studi in vitro sulla modulazione dell'espressione genica di fase 2 e sull'attività enzimatica si sono basati su vari modelli di linee cellulari, in particolare cellule derivate da carcinoma epatico, come le HepG2 umane e le Hepa1c1c7 di topo. SF e i suoi glutatione-coniugati hanno aumentato in modo significativo i livelli di mRNA della UDP-glucuronosiltransferasi (UGT)1A1 e della GSTA1 sia nelle cellule HepG2 che nelle cellule HT29 (*Basten et al.*, 2002).

Nelle cellule Hepa1c1c7 il trattamento con dosi crescenti di SF per 24 ore ha triplicato l'induzione massimale di NQO1, rispetto al caso controllo trattato con SF 2.5  $\mu$ M (*Matusheski et al.*, 2001). SF provoca risposte dose e tempo dipendenti, ma il livello di induzione e/o il tipo di enzima indotto variano in base alle linee cellulari, come riportato in uno studio comparativo che ha valutato l'effetto di SF 25  $\mu$ M sull'attività enzimatica dell'aldo-cheto reduttasi (AKR), di NQO1, di GST e della GR in sette linee cellulari: HepG2, MCF7, MDA-MB-231, LNCaP, HeLa e HT-29 (*Jiang et al.*, 2003).

Dosi non tossiche di SF hanno incrementato di 11-17 volte i livelli di NQO1, di AKR1C1 e di  $\gamma$ GCS (*Bonnesen et al.*, 2001).

Gli effetti sulla modulazione enzimatica di fase 2 sono stati ampiamente studiati nel tumore prostatico umano dove SF (0.1-15  $\mu$ M) ha aumentato in modo significativo l'espressione e l'attività di tali enzimi nelle cellule LNCaP, MDA Pca 2a, MDA PCA 2b, PC-3 e TSU-Pr1. In particolare SF ha causato una marcata induzione della trascrizione del gene di NQO1, accompagnata dall'aumento dell'attività enzimatica di NQO1 nelle cellule prostatiche in vitro (*Brooks et al., 2001*). Recentemente induzioni di GST e NQO1 sono state determinate in culture di cellule della vescica (*Zhang et al., 2006*). SF non è attivo solo nelle cellule tumorali, ma anche su linee cellulari non trasformate. Sono stati scoperti livelli altamente inducibili di NQO1 nella linea cellulare epiteliale RL34 non mutata di ratto, in cui la risposta fenotipica riassume più da vicino l'effetto rispetto a quanto osservato nel fegato di roditore (*McMahon et al., 2003*). Inoltre SF ha indotto l'espressione di NQO1 e delle isoforme A1 e A2 di GST in modo dose e tempo dipendente negli epatociti di ratto (*Payen et al., 2001*), anche se sono stati necessari trattamenti prolungati per ottenere livelli indotti di GST paragonabili a quelli osservati nelle cellule di epatoma (*Maheo et al., 1997*). Allo stesso modo, in culture primarie di epatociti umani appena isolati, SF ha modificato l'espressione di NQO1, ma non la trascrizione di GSTA1 (*Gross-Steinmeyer et al., 2004*).

Inoltre SF ha indotto enzimi detossificanti di fase 2 e l'espressione degli mRNA di UDPG1A1 e GSTA1 negli epatociti umani, nonostante l'aumento di UGT1A1 sia stato soggetto a variazioni individuali (*Petri et al., 2003*). Come altri ITC efficaci nel modulare la risposta enzimatica di fase 2 nelle cellule di mammifero in vitro, SF ha mostrato la sua azione anche in vivo. Somministrato ad alte dosi (fino a 1000  $\mu$ mol/kg al giorno) per 4 o 5 giorni, ha aumentato i livelli degli enzimi di fase 2 in fegato, polmoni, pancreas, stomaco, colon e ghiandole mammarie di topo e ratto (*Gerhauser et al., 1997; Keck et al., 2002; Matusheski et al., 2001*). A dosi minori (40  $\mu$ mol/kg al giorno) SF ha incrementato l'attività di GST e NQO1 nel duodeno, nella prima parte dello stomaco e soprattutto nella vescica (*Munday et*

*al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006). Infine, alle dosi assunte con la dieta, SF ha indotto, con meccanismo dose-dipendente, NQO1, ma non ha modificato l'attività di GST, di UGT e dell'epossidoidrolasi nei ratti (Yoxall *et al.*, 2005).

In generale, quindi, GST è marcatamente meno sensibile all'induzione mediata da SF, rispetto a NQO1. Tale discrepanza è dovuta probabilmente alle numerose sottoclassi di GST: quando viene misurata l'attività totale di GST, una forte induzione di una particolare subunità può essere mascherata parzialmente dall'attività di altre subunità. Nonostante ciò gli studi sull'uomo hanno evidenziato che un elevato consumo di *Brassicaceae* porta ad un aumento di attività di GST (Bogaards *et al.*, 1994; Petri *et al.*, 2003).

Concludendo, anche alle dosi dietetiche, SF può modulare i sistemi enzimatici che metabolizzano gli xenobiotici aumentando la detossificazione dei composti cancerogeni, un importante meccanismo di attività chemiopreventiva.



---

## **5 SCOPO DELLA TESI**

---

Le malattie cardiovascolari costituiscono la causa principale di morte, la causa più frequente di ricovero ospedaliero e una delle cause più importanti di invalidità; sono malattie di cui si conoscono bene i fattori di rischio cioè quelle caratteristiche che se presenti in una popolazione o in un individuo, indicano la maggiore probabilità di andare incontro alla malattia. Gli studi epidemiologici degli ultimi anni hanno dimostrato la reversibilità del rischio, cioè la possibilità di ridurre o di ritardare la comparsa degli eventi attraverso la modificazione dello stile di vita. Inoltre le malattie cardiovascolari sono fra le cause più frequenti che producono, in età avanzata, disabilità e deficit delle funzioni cognitive. In questo contesto di promozione del benessere psico-fisico e di prevenzione delle malattie cronico-degenerative mediante una alimentazione definita “ottimale”, si colloca la ricerca nutrizionale nell’ambito degli alimenti funzionali. La conoscenza delle basi biochimiche delle malattie ha indotto a verificare l’ipotesi di poter modulare le funzioni cellulari e potenziare i sistemi di difesa dell’organismo attraverso composti (nutrienti e soprattutto non nutrienti) presenti negli alimenti naturali. Qualora sia dimostrabile attraverso adeguati modelli sperimentali e successivi trial clinici un effetto monitorabile sulla salute dell’uomo è lecito parlare di effetti funzionali e qualificare un alimento (o un suo componente) come alimento funzionale.

Il ruolo acclarato dello stress ossidativo, determinato da uno sbilanciamento tra produzione di specie reattive dell’ossigeno e difese antiossidanti, nell’eziologia di diverse forme di patologie cardiache, tra cui l’aterosclerosi, il danno da ischemia-riperfusion, l’insufficienza cardiaca congestizia, nonché le cardiomiopatie farmaco indotte (*Kang, 2007; Kutala et al., 2007; McCord, 1985; Villamena et al., 2004*), ha portato ad una intensa indagine del potenziale ruolo

protettivo svolto da molecole antiossidanti presenti negli alimenti, nei confronti del danno ossidativo a livello cardiovascolare (*Lefer et al., 2000*). Sebbene studi in vitro e su modelli animali abbiano dimostrato che la somministrazione di antiossidanti esogeni può esercitare un effetto protettivo in disturbi cardiovascolari di tipo ossidativo (*Diplock et al., 1998; Giugliano, 2000; Wattanapitayakul et al., 2001*), lo studio dell'effetto di una assunzione dietetica di antiossidanti nella prevenzione di patologie nell'uomo ha dato risultati contrastanti, che potrebbero in parte essere giustificati da fattori quali una breve emivita, una limitata permeabilità cellulare ed una scarsa biodisponibilità di questi composti *in vivo* (*Bolli et al., 2004; Gaziano, 2004; Lonn et al., 2005; Seifried et al., 2007; Valko et al., 2007*).

Un'altra strategia per proteggere la cellula cardiaca dalla degenerazione legata al danno ossidativo consiste nella up-regolazione, per mezzo di induttori chimici naturali o di sintesi, di una serie di antiossidanti endogeni e di enzimi detossificanti di fase 2 del metabolismo degli xeno biotici (*Cao et al., 2006; Li et al., 2006b*). Benchè gli enzimi di fase 2 siano tradizionalmente identificati come quelli che catalizzano la coniugazione di ligandi endogeni, glutatione ed acido glucuronico, a substrati endo e xenobiotici, questa classificazione si sta espandendo fino ad includere proteine che catalizzano un ampio spettro di reazioni che conferiscono citoprotezione contro la tossicità di elettrofili e specie reattive dell'ossigeno (*Talalay, 2000*).

La conseguenza principale di tale induzione sarebbe quindi un rafforzamento della capacità antiossidante cellulare.

Negli ultimi anni, grande interesse è stato rivolto all'individuazione di alimenti, o di particolari micronutrienti in essi contenuti, in grado di modulare la sintesi endogena di questi enzimi.

Studi epidemiologici hanno evidenziato una correlazione inversa tra l'assunzione di Crucifereae ed il rischio di molte forme di cancro e questa associazione è risultata essere più stringente rispetto a quella tra il rischio di cancro e l'assunzione di frutta e verdura in generale (*van Poppel et al., 1999*). Dal momento che le Crucifereae, in

particolare i vegetali appartenenti al genere Brassica, sono caratterizzate in modo peculiare dal contenuto in glucosinolati, di cui rappresentano la principale fonte di assunzione della dieta umana, è a questi fitocomponenti che potrebbero essere ascritti gli effetti di promozione della salute (Zhang, 2004).

Gli ITC sono metaboliti secondari derivanti dall'idrolisi dei glucosinolati, una classe di composti presente nei vegetali della famiglia delle Brassicaceae. In particolare il sulforafane, prodotto metabolico del 4-metilsulfonilbutil glucosinolato, glucorafanina, presente prevalentemente nei broccoli, cavoli e cavolini di Brussel, è un composto a riconosciuta azione chemiopreventiva, il cui meccanismo è attribuibile alla capacità di indurre enzimi detossificanti di fase 2, la maggior parte dei quali possiede anche attività antiossidanti (Basten et al., 2002; Fahey et al., 1997; Thimmulappa et al., 2002), di inibire gli enzimi di fase 1 responsabili dell'attivazione di molte sostanze ad azione carcinogenica (Langouet et al., 2000), di indurre l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi (Gamet-Payraastre et al., 2000).

Mentre la up-regolazione del sistema di difesa antiossidante cellulare e degli enzimi di fase 2 si è dimostrato un approccio efficace nei confronti della carcinogenesi in modelli animali e trial clinici, l'attuale comprensione dell'effetto e del meccanismo d'azione di induttori chimici a livello cardiaco è ancora piuttosto limitata.

Una tale strategia citoprotettiva affonda le basi in una migliore e più profonda comprensione dei meccanismi e delle vie di trasduzione del segnale che regolano l'induzione dell'espressione dei diversi enzimi antiossidanti e di fase 2.

Il fatto che il sistema antiossidante endogeno sia regolato in modo coordinato ha fatto ipotizzare che tale regolazione avvenga tramite una via di segnalazione comune, quale quella rappresentata dal sistema nuclear factor E2-related factor 2/Antioxidant Responsive Element (Nrf2/ARE).

Studi recenti hanno evidenziato il ruolo chiave del fattore di trascrizione Nrf2, in grado di legarsi alla sequenza ARE nella regione

del promotore di numerosi geni citoprotettivi (*Motohashi et al., 2004*). Un confronto del profilo trascrizionale di topi geneticamente deficienti di Nrf2 rispetto al corrispondente wild-type, in seguito a trattamento con SF, ha permesso di identificare diversi nuovi geni target di questo composto chemiopreventivo, la cui regolazione a livello basale ed inducibile è mediata dall'azione di Nrf2 (*Thimmulappa et al., 2002*).

**Alla luce di quanto detto, scopo della ricerca riportata in questa tesi è stato valutare il potenziale effetto protettivo di tipo antiossidante indiretto, mediato dall'induzione degli enzimi detossificanti/antiossidanti nella cellula cardiaca, da parte di SF.**

Come modello di studio sono state utilizzate colture primarie di cardiomiociti neonatali di ratto. L'uso di tali colture permette l'osservazione diretta di quanto avviene a livello cellulare escludendo eventuali interferenze che si possono verificare nell'organo isolato o *in vivo*. Le cellule sono state trattate con SF 5  $\mu$ M per tempi differenti e sono state valutate sia la capacità di SF di ridurre la produzione intracellulare di ROS sia di proteggere le cellule dallo stress ossidativo. Per meglio caratterizzare il meccanismo sotteso sono stati valutati gli effetti di SF sia a livello di trascrizione genica che di traduzione dei principali enzimi detossificanti/antiossidanti di fase 2 quali GST, GR, GPx, TR, NQO1, SOD e CAT.

Oltre all'aspetto funzionale, un approccio fondamentale nella comprensione del meccanismo citoprotettivo ed ulteriore scopo di questa tesi è stato l'individuazione dei bersagli molecolari del SF e dell'influenza che questi esercitano nella induzione dell'attività trascrizionale ARE-mediata.



---

## **6 MATERIALI E METODI**

---

### **6.1 PREPARAZIONE DELLE COLTURE CELLULARI DI CARDIOMIOCITI NEONATALI (YAGEV ET AL., 1984)**

Le colture di cardiomiociti neonatali sono state allestite da cuori di ratti Wistar (Harlan-Italy) di 2-4 giorni di vita (*Yagev et al., 1984*). I ratti sono stati sacrificati per decapitazione, il torace inciso ed i ventricoli cardiaci prelevati. In figura 6.1 sono schematizzate le varie fasi del procedimento. I ventricoli, derivati da un numero variabile di 30-60 ratti, sono stati posti in un particolare medium, definito special medium (946 mg/100 mL Ham-F10,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  93 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  38.5 mM,  $\text{NaHCO}_3$  1.2 M ed inositolo 0.5 mM (Sigma-Aldrich Co.)), lavati in questo medium e finemente sminuzzati.

Lo special medium è stato quindi sostituito con il medium di tripsinizzazione, ottenuto aggiungendo tripsina (0.25% v/v) (Sigma-Aldrich Co.) allo special medium, in quantità di 1 mL per ogni 100 mg di tessuto. I frammenti di tessuto sono stati posti in un recipiente cilindrico sterile di vetro, chiusi e lasciati alla temperatura di 4°C overnight. Successivamente il medium contenente la tripsina è stato rimosso, lasciando il tessuto immerso in un piccolo volume residuo (meno di 1/10 del volume iniziale). Il recipiente è stato posto in un incubatore a 37°C,  $\text{CO}_2$  5%, umidità 95%, e lasciato in incubazione per 30 minuti, in agitazione continua.

Questo metodo di tripsinizzazione “a freddo” presenta il vantaggio di danneggiare solo in minima parte le cellule durante il periodo di disaggregazione, rispetto ai metodi che utilizzano esposizioni alla tripsina per tempi molto lunghi alla temperatura di 37°C. Infatti, la tripsina, il cui optimum di temperatura è intorno ai 37°C, durante le 18 ore a 4°C è pressoché inattiva, ma imbibisce i frammenti di tessuto cardiaco. I successivi 30 minuti a 37°C sono pertanto sufficienti ad

ottenere una disgregazione del tessuto senza determinare un danno alle cellule.

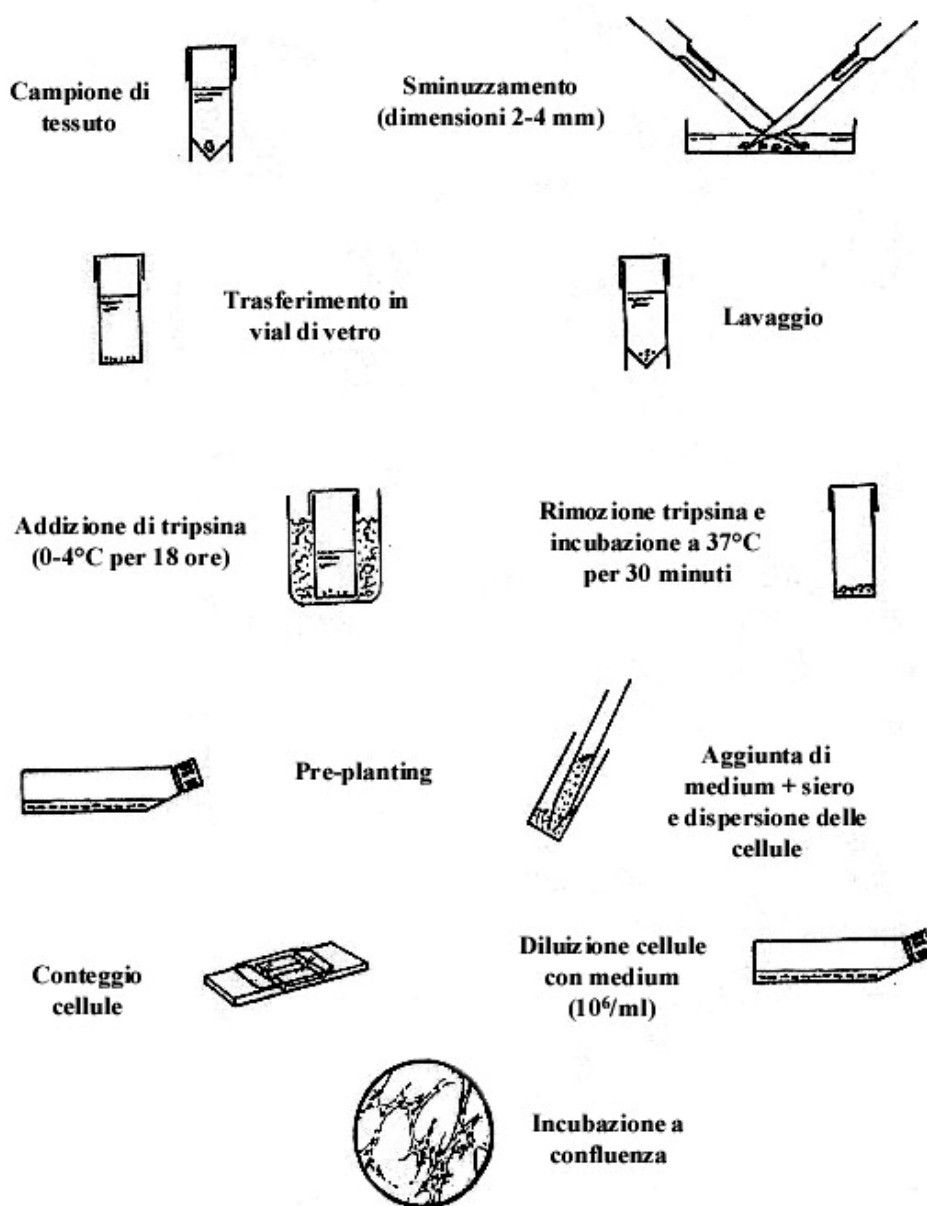
Si è quindi proceduto alla risospensione dei frammenti di tessuto in medium completo (DMEM F-12 supplementato con 10% (v/v) di siero bovino fetale (FCS), 10% (v/v) di siero di cavallo (HS), sodio piruvato 1mM, 1% gentamicina (v/v) ed 1% anfotericina B (v/v) (Sigma-Aldrich Co.)), in rapporto di 1 mL di medium/100 mg di tessuto iniziale. In tale medium le cellule sono state disgregate ulteriormente con l'ausilio di una pipetta pasteur sterile. La sospensione così ottenuta è stata filtrata attraverso una garza sterile in una fiasca per colture cellulari e incubata a 37°C, CO<sub>2</sub> 5%, umidità 95%, per 30 minuti. La fiasca è stata quindi ben agitata e la sospensione di cellule, travasata in una seconda fiasca, incubata nelle condizioni precedenti per 60 minuti.

Queste due fasi di incubazione della sospensione di cellule, definite di "pre-plating", hanno lo scopo di rendere la coltura di cardiomiociti la più pura possibile. In particolare, durante il "pre-plating", le cellule non muscolari presenti, caratterizzate da una maggiore adesività ai supporti di plastica, aderiscono saldamente al fondo della fiasca, mentre i cardiomiociti rimangono nella sospensione; quest'ultima risulterà quindi virtualmente "pura" al successivo travaso.

Terminate le fasi di "pre-plating", le cellule sono state contate con l'ausilio di un emocitometro e portate ad una concentrazione di  $5 \times 10^5$  cellule/mL attraverso una diluizione con medium completo.

La sospensione di cellule così ottenuta è stata seminata in piatti petri, piastre multipozzetto e fiasche ed incubata a 37°C, CO<sub>2</sub> 5%, umidità 95%.

Ogni 48 ore è stato effettuato il cambio medium: il medium di crescita delle cellule è stato aspirato con l'ausilio di una pompa da vuoto e sostituito con un nuovo medium DMEM F-12 completo.



**Figura 6.1:** metodo di Yagev per la preparazione delle colture di cardiomiociti neonatali.

## 6.2 SUPPLEMENTAZIONE CON SULFORAFANE

Il sulforafane (SF) (LKT Laboratories) è stato solubilizzato in dimetilsolfossido (DMSO) alla concentrazione 10 mM, conservato a -20°C e diluito alla concentrazione opportuna al momento dell'utilizzo in medium completo.

Le cellule, una volta giunte a confluenza, sono state trattate con SF 5 µM per tempi differenti (30minuti, 1, 3, 6, 12, 24 e 48 ore).

## 6.3 DETERMINAZIONE DELLE ATTIVITÀ ENZIMATICHE

### 6.3.1 Valutazione dell'attività dell'enzima *glutathione-S-transferasi* (GST)

Per la determinazione dell'attività della GST è stato impiegato un metodo che utilizza come substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), in grado di interagire con la maggior parte degli isoenzimi GST. Dopo coniugazione del gruppo tiolico del glutathione al CDBN, si verifica un incremento di assorbanza a 340 nm. La GST, infatti, catalizza la coniugazione del glutathione al substrato CDBN secondo la seguente reazione:



Il GS-DNB assorbe a 340 nm e l'entità dell'incremento di assorbanza è proporzionale all'attività della GST.

Sono state calcolate le variazioni di assorbanza ( $\Delta A_{340}$ )/min sia per i campioni sia per il bianco utilizzando la seguente equazione:

$$\Delta A_{340} / \text{min} = \frac{A_{340} (\text{finale}) - A_{340} (\text{iniziale})}{\text{Tempo di reazione (min)}}$$

L'attività di GST è stata calcolata attraverso l'equazione:

$$\text{dove: } \frac{A_{340} / \text{min} * V(\text{ml}) * \text{dil}}{\epsilon_{mM} * V_{enz}(\text{ml})} = \mu\text{mol} / \text{ml} / \text{min}$$

*dil:*

fattore di diluizione

$\epsilon_{mM}$  ( $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ):  $9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  coefficiente del coniugato di CDNB a 340 nm

$V$ : il volume di reazione

$V_{enz}$ : il volume dei campioni testati.

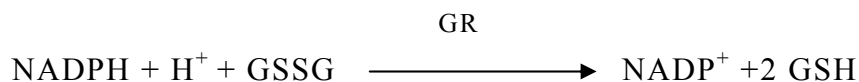
L'attività di GST è stata espressa come nmol/min/mg proteine.

I lisati cellulari utilizzati per la determinazione dell'attività della GST sono stati ottenuti staccando le cellule dal supporto di plastica, con l'ausilio di un "cell scraper", in 6 mL di PBS; le sospensioni cellulari così ottenute sono state centrifugate a 300xg per 10 minuti a 4°C ed il surnatante eliminato. Ai pellet sono stati aggiunti 150  $\mu\text{L}$  di tampone di lisi (Cell Lytic and Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich Co.)). I campioni sono stati mantenuti a 4°C per 60 minuti, vortexando ogni 10 minuti per favorire la lisi cellulare.

I campioni sono stati infine centrifugati a 12,000 g per 15 minuti per far precipitare i debris cellulari non lisati, il surnatante è stato rimosso, aliquotato e conservato a -80°C ed utilizzato entro una settimana.

### 6.3.2 Valutazione dell'attività dell'enzima glutatione reduttasi (GR)

Per la determinazione dell'attività della GR è stato impiegato un metodo che si basa sulla riduzione di GSSG (2mM) ad opera del NADPH (2mM) in presenza di glutatione reduttasi:



Il glutathione ridotto formato può successivamente reagire in maniera spontanea con acido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) (3mM) secondo la seguente reazione:



La prima reazione può essere misurata attraverso una riduzione di assorbanza a 340 nm, provocata dalla diminuzione di NADPH, mentre la seconda attraverso un aumento di assorbanza a 412 nm, dato da un aumento di TNB.

In entrambi i casi le variazioni rilevate sono proporzionali all'attività dell'enzima GR.

L'attività dell'enzima è stata calcolata utilizzando la formula:

$$\text{unità/ml} = \frac{(\Delta A_{\text{campione}} - \Delta A_{\text{bianco}}) * \text{dil}}{\epsilon_{mM} * V_{\text{campione}} (\text{ml})}$$

per NADPH  $\epsilon_{mM} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

per TNB  $\epsilon_{mM} = 14.15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Un'unità di GR è quella che causa la riduzione di 1  $\mu\text{mol}$  di DTNB a TNB a 25°C, pH 7.5.

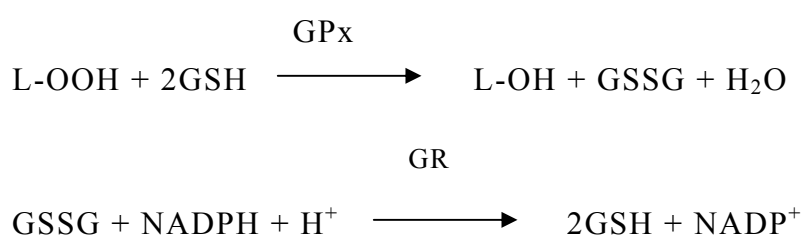
I lisati cellulari utilizzati per la determinazione dell'attività della GR sono stati ottenuti staccando le cellule dal supporto di plastica, con l'ausilio di un "cell scraper", in 6 mL di PBS; le sospensioni cellulari così ottenute sono state centrifugate a 300xg per 10 minuti a 4°C ed il surnatante eliminato. Ai pellet sono stati aggiunti 150  $\mu\text{L}$  di tampone di lisi (Cell Lytic and Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich

Co.). I campioni sono stati mantenuti a 4°C per 60 minuti, vortexando ogni 10 minuti per favorire la lisi cellulare.

I campioni sono stati infine centrifugati a 12,000 g per 15 minuti per far precipitare i debris cellulari non lisati, il surnatante è stato rimosso, aliquotato e conservato a -80°C ed utilizzato entro una settimana.

### **6.3.3 Valutazione dell'attività dell'enzima glutatione perossidasi (GPx)**

L'attività della GPx-1 è stata determinata con il metodo di Paglia e Valentine (1967), modificato da Gunzler et al. (1974), utilizzando terbutil-idroperossido (Sigma-Aldrich Co.) come substrato. E' un metodo di determinazione enzimatica indiretta basato sull'ossidazione del GSH a GSSG, catalizzato dalla GPx. La rigenerazione del GSH è ottenuta accoppiando la precedente reazione a quella catalizzata dalla glutatione reduttasi (GR) che riduce il GSSG a GSH. La riduzione del GSSG si accompagna all'ossidazione del NADPH a NADP<sup>+</sup>. La diminuzione di assorbanza a 340 nm, lunghezza d'onda che rappresenta il massimo di assorbimento del NADPH, indica l'entità dell'ossidazione del NADPH a NADP<sup>+</sup>. Questo è indicativo dell'attività della GPx, poiché la reazione catalizzata dalla GPx rappresenta la tappa limitante l'intero processo catalitico.



Al termine di ogni esperimento le cellule sono state lavate con PBS e ad ogni piatto sono stati aggiunti 2 mL di tampone potassio fosfato 50 nM, pH 8, contenente EDTA 0.5 mM (Sigma-Aldrich Co.). Le cellule, mantenute in ghiaccio, sono state rimosse dal supporto di plastica mediante l'utilizzo di un "cell scraper". La sospensione di cellule così ottenuta è stata omogenata utilizzando un potter a bassissima velocità.

I campioni sono stati centrifugati a 4°C a 2000 g per 25 minuti ed è stato prelevato il sovranatante. L'attività della GPx è stata valutata spettrofotometricamente su aliquote del surnatante ottenuto dai diversi campioni in presenza di NADPH 5 mM, GSH 42 mM e 10 U/mL di glutatione reduttasi. La reazione è stata infine avviata con l'aggiunta di 10 µL di terbutil-idroperossido 30 mM.

L'attività della GPx-1 è stata espressa come mU/mg di proteina. La concentrazione proteica è stata valutata utilizzando il metodo di Bradford (1976).

Un'unità di GPx è la quantità di enzima in grado di determinare la formazione di 1 µmol/min di NADP<sup>+</sup> a pH 8.0, ad una temperatura di 25°C in presenza di GSH, glutatione reduttasi e terbutil-idroperossido 30 mM.

#### ***6.3.4 Valutazione dell'attività dell'enzima superossido dismutasi (SOD)***

Per la determinazione dell'attività della SOD è stato impiegato un metodo che sfrutta la capacità del sale monosodico 2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio (WST-1), solubile in acqua, di formare un sale di formazano, che assorbe alla lunghezza d'onda di 450 nm quando reagisce in presenza di anione superossido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Il sistema di reazione utilizza come fonte di O<sub>2</sub><sup>-</sup> la reazione tra xantina e xantina ossidasi. La SOD, presente nel campione, sequestra parte di O<sub>2</sub><sup>-</sup> prodotto riducendolo ad acqua ossigenata (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e ossigeno (O<sub>2</sub>), impedendogli di reagire con WST-1 e formare il sale di formazano colorato. L'assorbanza è stata misurata utilizzando un lettore di piastre multipozzetto (VICTOR3 V™ Multilabel Counter, Perkin Elmer).

Al termine di ogni esperimento le cellule sono state lavate con PBS e ad ogni piatto sono stati aggiunti 1 mL di tampone potassio fosfato 100 mM, pH 7.5, contenente EDTA 1 mM (Sigma-Aldrich Co.). Le cellule, mantenute in ghiaccio, sono state rimosse dal supporto di plastica mediante l'utilizzo di un "cell scraper". La sospensione di cellule così ottenuta è stata sottoposta a 2 cicli di gelo/sgelo per



favorire la lisi cellulare. I campioni sono stati centrifugati a 4°C a 12,000 g per 15 minuti ed è stato prelevato il surnatante su cui è stata effettuata la determinazione enzimatica.

L'attività della SOD, è stata calcolata come percentuale d'inibizione rispetto al bianco.

$$\% \text{ inibizione} = [(A_{\text{bianco}} - A_{\text{campione}}) / A_{\text{bianco}}] \times 100$$

Costruendo una retta di taratura utilizzando concentrazioni note di SOD (Sigma) è possibile calcolare l'attività dei campioni in U/mg di proteina:

dove:

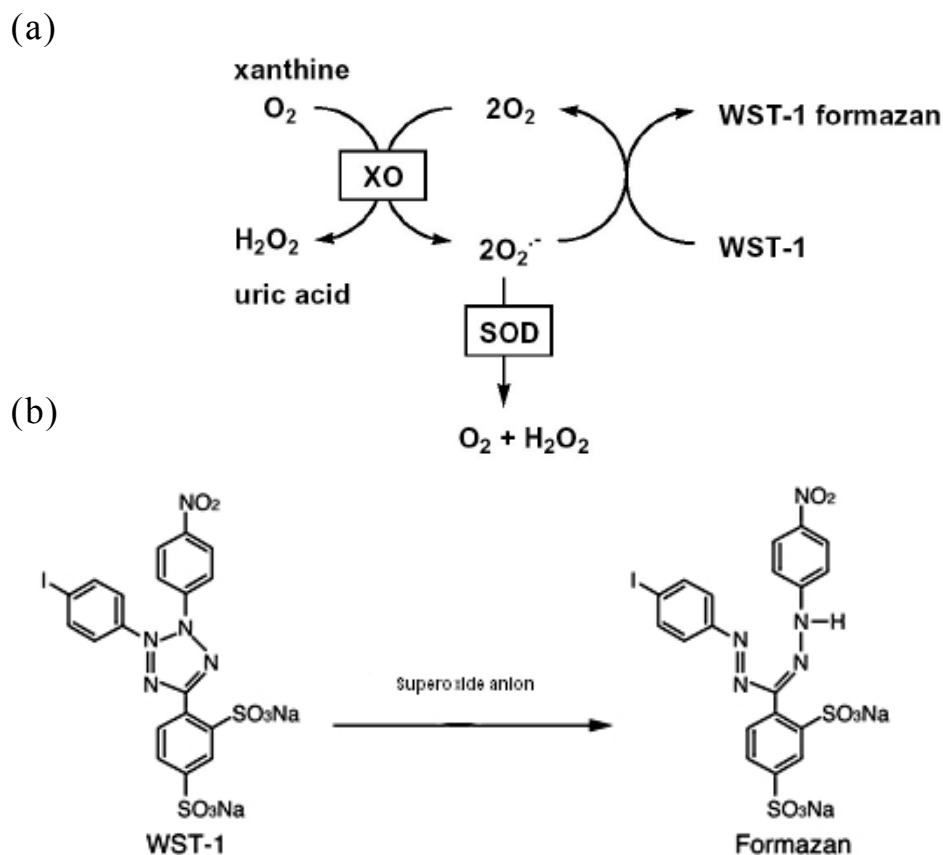
$$\frac{(\% \text{ inibiz campione} - y \text{ intercetta}) * \text{diluizione} * mg_p}{Pendenza * V_{enz}(ml)} = U/mg_p$$

**y intercetta:** valore di intersezione tra la retta di taratura e l'asse delle ordinate

**pendenza:** coefficiente angolare della retta di taratura

**mg<sub>p</sub>:** mg di proteine contenute nel campione

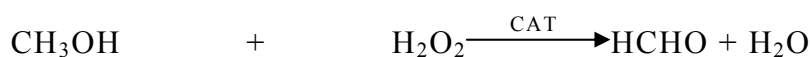
Il sistema di reazione è schematizzato in figura 6.2a, mentre la reazione di formazione del sale di formazano è riportata in figura 6.2b. Un'unità di SOD inibisce del 50% la riduzione del citocromo c in un sistema accoppiato con XO a pH 7,8 e temperatura di 25°C.



**Figura 6.2:** determinazione dell'attività della SOD. **(a)** schematizzazione del sistema di reazione per la determinazione dell'attività della SOD. Si può notare come la SOD sottraendo anione superossido al sistema impedisca l'ossidazione di WST-1 a formazano determinando così una riduzione dell'assorbimento della soluzione a 450nm. **(b)** modificazione della struttura del WST-1 in seguito alla reazione con  $O_2^-$

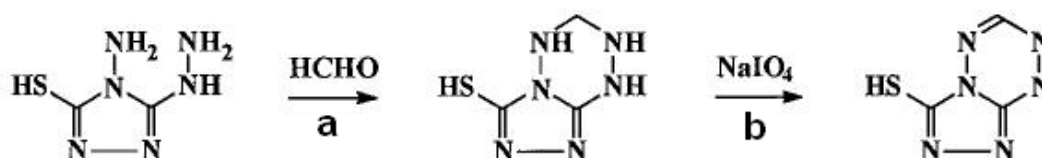
### 6.3.5 Valutazione dell'attività dell'enzima catalasi (CAT)

Il metodo si basa sulla reazione della CAT con il metanolo ( $CH_3OH$ ) in presenza di una concentrazione ottimale di acqua ossigenata ( $H_2O_2$ ):



La reazione, che produce formaldeide (HCHO), viene bloccata dopo un tempo di 20 minuti (tempo di reazione) con l'aggiunta di idrossido di potassio 4M (KOH).

La formazione di HCHO è misurata spettrofotometricamente grazie all'utilizzo del cromogeno Purpald (4-ammino-3-idrazino-5-mercapto-1,2,4-triazolo). In presenza di aldeidi il Purpald forma un eterociclo biciclico (figura 6.3 a) che, in presenza di periodato ( $\text{IO}_4^-$ ), cambia la propria colorazione con un massimo di assorbimento alla lunghezza d'onda di 540 nm (figura 6.3 b). L'assorbanza è stata misurata utilizzando un lettore di piastre multipozzetto (VICTOR3 V<sup>TM</sup> Multilabel Counter, Perkin Elmer).



**Figura 6.3:** (a) reazione di ciclizzazione tra Purpald e formaldeide, (b) il prodotto della ciclizzazione viene ossidato in presenza di anione periodato per formare un composto che assorbe alla lunghezza d'onda di 540 nm.

Al termine di ogni esperimento le cellule sono state lavate con PBS e ad ogni piatto sono stati aggiunti 1 mL di tampone potassio fosfato 100 mM, pH 7.5, contenente EDTA 1 mM (Sigma-Aldrich Co.). Le cellule, mantenute in ghiaccio, sono state rimosse dal supporto di plastica mediante l'utilizzo di un "cell scraper". La sospensione di cellule così ottenuta è stata sottoposta a 2 cicli di gelo/sgelo per favorire la lisi cellulare. I campioni sono stati centrifugati a 4°C a 12,000 g per 15 minuti ed è stato prelevato il surnatante su cui è stata effettuata la determinazione enzimatica.

Dopo aver costruito una retta di taratura utilizzando HCHO standard a diverse concentrazioni, l'attività della CAT è stata calcolata secondo la seguente formula:

$$\frac{(\text{Assorbanza campione} - y \text{ intercetta}) * \text{diluizione} * \text{mg}_p}{\text{Pendenza} * \text{tempo di reazione} * V_{enz}(ml)} = \text{nmol/min/mg}_p$$

dove:

**y intercetta**: valore di intersezione tra la retta di taratura e l'asse delle ordinate

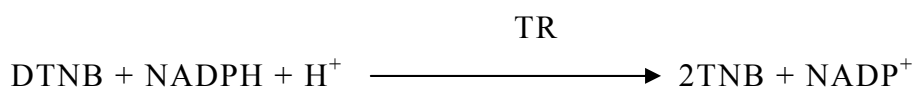
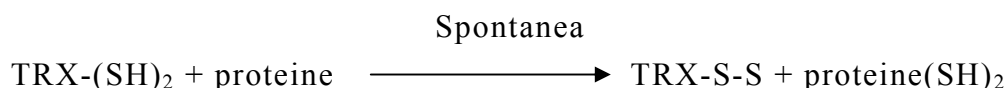
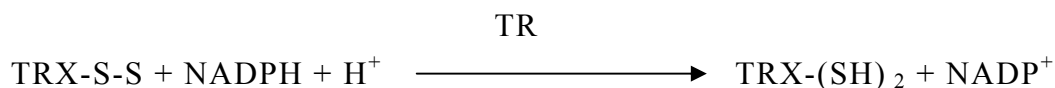
**pendenza**: coefficiente angolare della retta di taratura

**mg<sub>p</sub>**: mg di proteine contenute nel campione

### 6.3.6 Valutazione dell'attività dell'enzima tioredoxina riduttasi (TR)

Per la determinazione dell'attività della tioredoxina riduttasi è stato utilizzato un saggio colorimetrico basato sulla riduzione NADPH mediata del DTNB, che porta alla produzione di TNB, caratterizzato da un'intensa colorazione gialla, misurata a 412 nm (*Holmgren et al., 1995*).

La reazione di riduzione, mediata in vivo dalla tioredoxina riduttasi, si verifica secondo il seguente schema:



Per ogni mole di NADPH ossidato si formano due moli di TNB.

Il saggio è stato effettuato a temperatura ambiente (25°C) ed il massimo di assorbimento per il TNB si verifica a 412 nm (coefficiente di estinzione molare 14,150 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>).

Nei campioni biologici sono presenti altri enzimi, quali la glutatione reduttasi e la glutatione perossidasi, in grado di ridurre il DTNB, perciò, per evitare di ottenere dei falsi positivi, è stato impiegato un inibitore specifico della tioredoxina reduttasi.

In primo luogo è stata misurata la riduzione totale di DTNB e successivamente la riduzione in presenza di inibitore, la differenza tra i due risultati ha fornito la riduzione di TNB dovuta alla sola tioredoxina reduttasi.

Al termine di ogni esperimento le cellule sono state lavate con PBS freddo e staccate dal supporto di plastica con l'ausilio di un "cell scraper" in 6 mL di PB. Le sospensioni cellulari così ottenute sono state centrifugate a 300xg per 10 minuti a 4°C ed il surnatante eliminato. Ai pellet sono stati aggiunti 150 µL di tampone di lisi (Cell Lytic and Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich Co.)). I campioni sono stati mantenuti a 4°C per 60 minuti, vortexando ogni 10 minuti per favorire la lisi cellulare. I campioni sono stati infine centrifugati a 12,000 g per 15 minuti per far precipitare i debris cellulari non lisati, il surnatante è stato rimosso, aliquotato e conservato a -80°C ed utilizzato entro una settimana.

L'attività dell'enzima è stata calcolata attraverso la seguente formula:

$$\text{unità/ml} = \frac{\Delta A_{412}/\text{min (tioredoxina reduttasi)} * \text{dil}}{V_{enz}(\text{ml})}$$

Dove:

$\Delta A_{412}/\text{min (tioredoxina reduttasi)}$  =  $\Delta A_{412}/\text{min (campione)} - \Delta A_{412}/\text{min (campione + inibitore)}$

**dil**: fattore di diluizione

$V_{enz}$ : il volume dei campioni testati.

Un'unità di TR è quella che causa un incremento nell'assorbanza misurata a 412 nm di 1.0 per minuto a 25°C, pH 7.0.

### **6.3.7 Valutazione dell'attività dell'enzima NADPH chinone reduttasi (NQO1)**

Il saggio della chinone reduttasi è stato effettuato misurando la riduzione di MTT NADPH-dipendente menadiolo-mediata (Prochaska et al., 1988) (figura 6.4).

Eliminato il medium dalle cellule seminate in piastre da 96 pozzetti, sono stati addizionati 50 µL di lysis solution (0.8% digitonina, 2mM EDTA, pH 7.8) in ogni pozzetto. Le piastre sono state poste su un agitatore di piastre e agitate a 300 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente. Successivamente sono stati aggiunti 200 µL di mix di reazione [6.225 mL di TRIS-HCl 0,5 M, 83 mg di albumina sierica bovina (BSA), 830 µL di Tween 20 (1,5%), 83 µL di FAD 7.5 mM, 830 µL di glucosio 6-fosfato (G6P) 150 mM, 74.7 µL di NADP 50 mM, 1.7 mL di glucosio 6-P deidrogenasi (250U), 37.35 mg di MTT e acqua bidistillata fino ad un volume finale di 125 mL]. E' stata quindi rilevata l'assorbanza a 595 nm, mediante spettrofotometro.

L'attività dell'enzima è stata calcolata attraverso la seguente formula:

$$\frac{\Delta_{595} / \text{min} * V(\text{ml}) * \text{dil}}{\epsilon_{mM} * V_{enz}(\text{ml})}$$

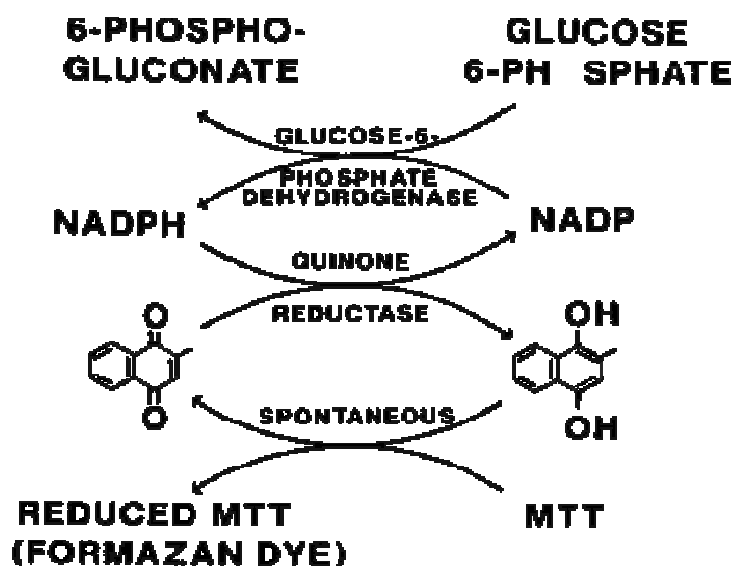
Dove:

**dil:** fattore di diluizione

**$V_{enz}$ :** 5 µL volume dei campioni testati

**$V(\text{ml})$ :** 0.2 volume totale

**$\epsilon_{mM}$**  0.55  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$



*Figura 6.4: schema delle reazioni di riduzione dell'MTT (Prochaska et al., 1988).*

#### 6.4 VALUTAZIONE DEI LIVELLI INTRACELLULARI DI GLUTATIONE RIDOTTO (GSH)

Il glutathione è uno dei più importanti sistemi antiossidanti endogeni. Si trova ubiquitariamente all'interno della cellula e contribuisce al mantenimento dello stato redox ottimale. Esiste sia nella forma ridotta (GSH), sia in quella ossidata (GSSG) e partecipa alle reazioni redox attraverso l'ossidazione dei gruppi tiolici.

Il contenuto di GSH intracellulare è stato determinato utilizzando la sonda fluorescente monoclorobimano (MCB). GSH viene coniugato in modo specifico da MCB formando l'addotto fluorescente GSH-bimano, attraverso una reazione catalizzata dalla glutathione S-transferasi. La concentrazione dell'addotto aumenta progressivamente durante i primi 10-12 minuti di reazione seguendo una cinetica di primo ordine.

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti. Dopo la supplementazione con SF il medium è stato rimosso e le cellule sono state lavate con 0.2 mL di PBS per due volte ed incubate a 37°C per 30 minuti in 0.1 mL di PBS contenente MCB 25 µM.

Dopo l'incubazione l'intensità di emissione è stata determinata a 460 nm, in seguito ad eccitazione a 355 nm, utilizzando un lettore di piastre multipozzetto (VICTOR3 V™ Multilabel Counter, Perkin Elmer).

## **6.5 VALUTAZIONE DELLA FORMAZIONE INTRACELLULARE DI SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO (ROS)**

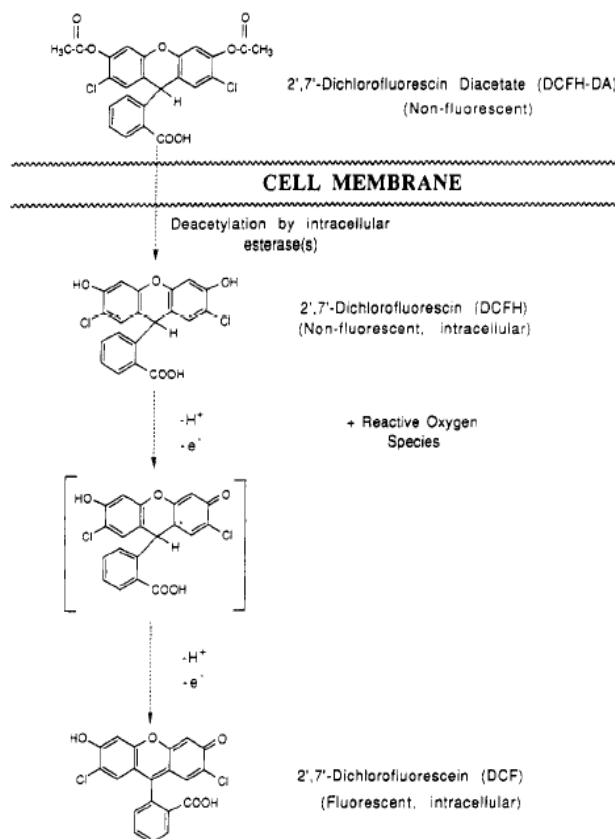
La valutazione dello stress ossidativo cellulare è stata effettuata utilizzando 2',7'-diclorofluorescina diacetilata (DCFH-DA). Tale composto diffonde attraverso le membrane all'interno della cellula dove viene enzimaticamente deacetilata da esterasi intracellulari che la riducono a DCFH, un composto più idrofilo e non fluorescente. In presenza di specie reattive dell'ossigeno, DCFH è rapidamente ossidata nel composto fluorescente DCF (figura 6.5).

Le cellule seminate in piastre da 96 pozzetti, sono state pretrattate con SF per tempi differenti (6, 12, 24 e 48 ore), al termine dei quali sono state lavate con PBS; ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µL di soluzione di lavoro (soluzione di DCFH-DA in DMSO 10 µg/mL) per 30 minuti.

Successivamente le cellule sono state sottoposte a stress ossidativo mediante l'aggiunta H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100µM (100 µL per pozzetto). Dopo 30 minuti, l'intensità di emissione di fluorescenza è stata determinata a 535 nm in seguito ad eccitazione a 485 nm, utilizzando un lettore di piastre multipozzetto (VICTOR3 V™ Multilabel Counter, Perkin Elmer).

L'attività antiossidante intracellulare è stata espressa come percentuale di inibizione delle ROS intracellulari prodotte in seguito all'esposizione al perossido di idrogeno.





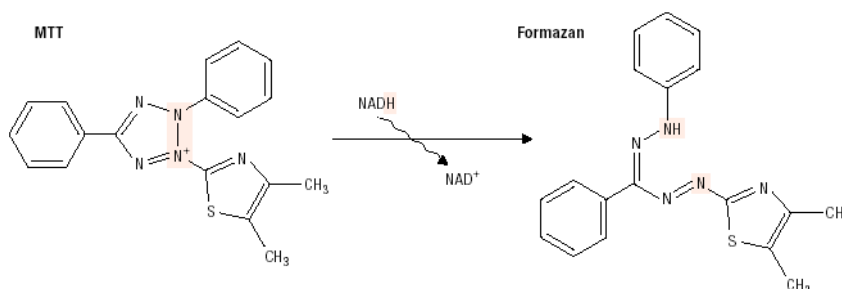
**Figura 6.5:** meccanismo d'azione della DCFH nella valutazione della produzione di ROS .

## 6.6 ANALISI DELLA VITALITÀ CELLULARE

La vitalità cellulare è stata determinata con il saggio del MTT.

Il metodo si basa sulla riduzione, da parte delle cellule vitali, del 3-[4,5-dimetiltiazolo-2-il]-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT) di colore giallo in un sale insolubile di formazano di colore blu (figura 6.6).

L'MTT è ridotto a formazano dalla succinato deidrogenasi, che appartiene alla catena respiratoria mitocondriale ed è attiva solo in cellule vitali.



**Figura 6.6:** reazione intracellulare di formazione di formazano da MTT.

E' stata preparata una soluzione stock di MTT 5 mg/ml in PBS sterile, conservata a -20°C.

Questa soluzione è stata aggiunta direttamente al medium di coltura in modo da ottenere una concentrazione finale di MTT 0.5 mg/mL. Le cellule sono state poste in incubatore, dopo 1 h è stato eliminato il medium contenente MTT ed è stato aggiunto dimetilsolfossido (DMSO) con il duplice fine di lisare le cellule e solubilizzare i cristalli di formazano formati.

L'assorbanza di questa soluzione è stata determinata a 595 nm utilizzando un lettore di piastre multipozzetto (VICTOR3 V™ Multilabel Counter, Perkin Elmer). La vitalità è stata espressa come percentuale rispetto ai valori di assorbanza ottenuti per le cellule controllo.

## 6.7 TECNICHE DI IMMUNOBLOTTING

Al termine del trattamento le cellule sono state lavate con PBS freddo senza Ca<sup>+2</sup> e Mg<sup>+2</sup> e staccate dai piatti di coltura con l'utilizzo di un

cell scraper. Mediante centrifugazione a 300 x g per 5 min si è ottenuto un pellet cellulare che è stato risospeso in tampone di lisi (Tris (50mM), Triton X-100 (0.1%), NaCl (150mM) e EGTA/EDTA (2 mM) a pH 7.4, contenente “mammalian protease inhibitor cocktail” 1%, sodio pirofosfato (1 mM), fenetilmetsulfonil fluoruro (0.5 mM), sodio vanadato (1 mM) e sodio fluoruro (50 mM)). Il lisato ottenuto è stato trasferito in eppendorf e lasciato riposare in ghiaccio per 45 min. Il lisato è stato poi centrifugato a 14,000 x g per 5 min a 4° C per rimuovere detriti cellulari e nuclei. La concentrazione di proteine nel sovrantante è stata determinata tramite il metodo di Bradford. I campioni così ottenuti sono stati trattati con Loading Buffer (Tris-Cl 1M pH 6.8, SDS 8%, glicerolo 20%, blu di bromofenolo 0.024% e  $\beta$ -mercaptoetanololo 4%; quest’ultimo è aggiunto solo al momento dell’uso) e successivamente bolliti per 5 minuti; tale processo conduce alla denaturazione delle proteine con scissione di eventuali ponti disolfuro.

Dopo aver allestito la camera per SDS-PAGE, una quantità pari a 20  $\mu$ g di proteine per ciascun campione è stata sottoposta ad elettroforesi su gel di poliacrilammide al 10% (per un gel di circa 10 mL occorrono: 4.0 mL di H<sub>2</sub>O, 3.4 mL di acrilammide 30%, 2.6 mL di tampone Tris, pH 8.8 1.5 M, 100  $\mu$ L di SDS 10%, 100  $\mu$ L di ammonio persolfato 10% e 4.0  $\mu$ L di TEMED) applicando una differenza di potenziale di 80 mVolt per almeno 60 minuti.

Al termine della corsa elettroforetica, le bande separate sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa Hybond™-C Extra (GE Healthcare) tramite elettroblotting, applicando una differenza di potenziale di 110 mVolt per 90 minuti. Successivamente la membrana è stata saturata per un’ora circa con latte fat-free in polvere al 5% (w/v) in TBS Tween (Tris 20 mM pH 7.6, NaCl 150 mM, Tween-20 0.1%) ed incubata con l’anticorpo primario per tutta la notte a 4°C su scuotitore orbitante.

Sono stati impiegati i seguenti anticorpi primari: anti-glutatione-S-transferasi  $\alpha$  (Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX, USA), anti-glutatione reduttasi (Labfrontier, Seoul, Korea), anti-

tiorredoxina reduttasi I (Upstate, Lake Placid, NY, USA), anti-glutathione perossidasi I (LabFrontier, Seoul, Korea), anti-NADPH chinone ossido reduttasi 1, anti-Nrf2 (Santa Cruz Biotechnology), anti-Phospho ERK 1/2, anti-Phospho Akt (Cell Signaling Technology). Gli anticorpi anti- $\beta$  actina (Sigma Aldrich), anti laminina A/C (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) sono stati utilizzati come controlli di carica.

Dopo tre lavaggi con TBS/Tween, la membrana è stata incubata per 60 minuti con l'opportuno anticorpo secondario anti-IgG di coniglio o di topo, coniugato con perossidasi.

Trascorso il tempo indicato, sono stati eseguiti altri tre lavaggi con TBS/Tween e si è proceduto alla rivelazione. Questa è stata effettuata incubando la membrana di nitrocellulosa, per un minuto, con una soluzione di rivelazione enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit (GE Healthcare), che genera chemiluminescenza per effetto dell'attività della perossidasi legata all'anticorpo secondario.

Le bande sono state visualizzate utilizzando un Versa-Doc 4000 Imaging System (Bio-Rad) ed analizzate usando Quantity One 1-D Analysis software (BioRad). I pesi molecolari delle bande sono stati calcolati per confronto con degli standards (PageRuler™ plus Prestained Protein Ladder, Fermentas, MW 10 – 250 kDa) che sono stati fatti correre in parallelo con i campioni.

## **6.8 ANALISI RT-PCR PER LO STUDIO DELL'ESPRESSIONE GENICA**

I cardiomiociti sono stati trattati con SF 5 $\mu$ M per tempi differenti (30 min-48 h). L'RNA totale è stato estratto usando il RNeasy® Mini Kit (Qiagen), seguendo il protocollo del produttore. Il cDNA è stato sintetizzato utilizzando il ReactionReady™ First Strand cDNA Synthesis Kit seguendo le istruzioni del produttore (Superarray, Frederick, MD, USA). In breve la trascrizione inversa è stata condotta a 37°C per 60 min, e la reazione è stata bloccata tramite riscaldamento a 95° per 5 min. La PCR è stata effettuata in un volume di 25  $\mu$ L

contenente ReactionReady™ HotStart Sweet PCR master mix, 0.4 µM di ogni primer (Superarray) e 1 µL di cDNA diluito. L'amplificazione del cDNA è stata avviata denaturando i campioni per 10 min a 95°C, seguiti da 35 cicli di 15 sec a 95° C, 30 sec a 55° C e 30 sec a 72° C. Infine i campioni sono stati tenuti a 72° C per 7 min al fine di garantire la completa estensione dei prodotti della PCR.

La dimensione dei frammenti è stata prevista sulla base della sequenza del mRNA, come riportato nella tabella 1.

**Tabella 1**

Gene	RefSeq Accession # <sup>1</sup>	Amplicon (bp)
GPX1	NM_030826	156
GR	NM_053906	139
GSTp2	NM_138974	61
NQO1	NM_017000	137
TR	NM_031614	87
Nrf2	NM_031789	135

<sup>1</sup> NCBI Nucleotide Sequence Database accession number

Dieci µL dei prodotti amplificati sono stati separati tramite elettroforesi in gel di poliacrilammide al 10% in TBE buffer (pre-cast gel, Bio-Rad). Le bande sono state colorate con bromuro di etidio e visualizzate sotto luce UV utilizzando un Versa-Doc 4000 Imaging system (Bio-Rad).

Come standard interni sono stati utilizzati GADP (390 bp) (Superarray) o QUANTUM mRNA Beta-actina (294 bp) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

## 6.9 ESTRAZIONE NUCLEARE

La frazione nucleare è stata ottenuta utilizzando un kit specifico (Active Motif, Inc., Carlsbad, CA). Le cellule sono state lavate con una soluzione di PBS freddo (tampone fosfato 10 mM, pH 7.5, NaCl 150mM, KCl 2.7 mM) contenente un cocktail di inibitori delle fosfatasi (125 mM NaF, 250 mM β-glicerofosfato, 250 mM p-nitro

fenilfosfato, 25 mM NaVO<sub>3</sub>) al 5% (v/v) e successivamente staccate dal piatto di coltura con l'ausilio di un cell scraper. La sospensione così ottenuta è stata centrifugata a 300 x g per 5 minuti per ottenere un pellet cellulare che è stato poi risospeso in 500 µL di buffer ipotonico (Hepes 20mM, pH7.5, NaF 5mM, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 10µM, EDTA 0.1mM) e mantenuto in ghiaccio per 15 min al fine di rigonfiare la membrana cellulare e renderla più fragile. La successiva aggiunta di 25µL di detergente (Nonidet P-40, concentrazione finale 0.5%) causa la fuoriuscita delle proteine citoplasmatiche nel sovrnatante. I campioni vengono centrifugati a 14,000 x g per 30 sec, il surnatante eliminato ed i nuclei precipitati vengono lisati e le proteine nucleari solubilizzate in un lysis buffer contenente cocktail di inibitori delle proteasi 1% (v/v) e DTT 10 mM 10% (v/v).

Dopo 30 min il sovrnatante (frazione nucleare) viene separato con una centrifugazione finale a 14,000 x g per 10min.

La concentrazione delle proteine nucleari negli estratti è stata determinata mediante il metodo di Bradford.

## **6.10 LOCALIZZAZIONE NUCLEARE DEL FATTORE DI TRASCRIZIONE NRF2**

Per analizzare l'accumulo del fattore di trascrizione NF-E2-related factor, (Nrf2) a livello nucleare, la frazione nucleare è stata analizzata utilizzando il kit Trans AMTM Nrf2 (Active Motif, Inc., Carlsbad, CA). Questo kit combina la metodica ELISA con un saggio specifico per i fattori di trascrizione. Il saggio è stato eseguito in piastre da 96 pozzetti nei quali è immobilizzata la sequenza oligonucleotidica contenente la porzione della sequenza a cui la forma attiva di Nrf2, presente negli estratti nucleari, si lega in modo specifico (5'-GTCACAGTGACTCAGCAGAATCTG-3').

In ogni pozzetto sono stati aggiunti 10 µL di campione diluito in complete lysis buffer (DTT 1% (v/v), protease inhibitor cocktail 10% (v/v) corrispondenti a 5 µg di proteina e 40 µL di complete binding buffer (contenente DTT 1% (v/v), Herring Sperm DNA 10% (v/v)). Il

controllo positivo è rappresentato da un estratto nucleare ottenuto dalla linea cellulare Cos-7 transfettata per Nrf2 e corrisponde a 1.25 µg proteina (0.5 µL di estratto nucleare Nrf2 in 9.5 µL di complete lysis buffer).

La piastra è stata incubata a temperatura ambiente per 1 h durante la quale si verifica il legame di Nrf2 alla sequenza ARE. In due successive incubazioni di 1 h è stato poi aggiunto l'anticorpo primario anti-Nrf2, diluito 1:1000, che riconosce uno specifico epitopo sulla proteina Nrf2 in seguito a legame col DNA e l'anticorpo secondario HRP-coniugato, diluito 1:1000. L'aggiunta di una soluzione di sviluppo produce una colorazione blu che una successiva aggiunta di una stop solution fa virare al giallo la cui assorbanza a 450 nm è stata letta mediante un lettore di piastre multipozzetto (VICTOR3 V™ Multilabel Counter, Perkin Elmer).





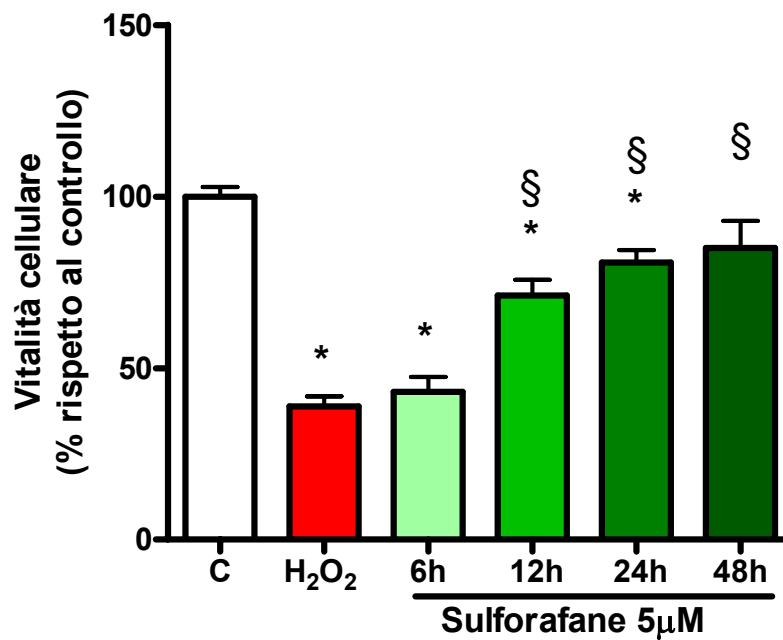
### **7.1 EFFETTO CITOPROTETTIVO DEL SULFORAFANE IN CELLULE CARDIACHE IN CULTURA**

Il sulforafane è un composto dotato di riconosciute proprietà chemiopreventive. Il meccanismo alla base di questo effetto sottende la modulazione del sistema antiossidante endogeno.

Volendo utilizzare queste capacità di biomodulazione per verificare la possibilità di attuare una strategia citoprotettiva anche in cellule non mutate, ma esposte a stress ossidativo in condizioni patologiche, come le cellule cardiache, la prima osservazione ha riguardato la valutazione della vitalità cellulare in seguito a trattamento con SF in cardiomiociti neonatali in coltura utilizzati come sistema modello.

I cardiomiociti sono stati trattati con SF 5  $\mu$ M per tempi differenti e successivamente sottoposti ad insulto ossidativo simulato da un trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100  $\mu$ M

In figura 7.1 è riportata la vitalità cellulare di colture di cardiomiociti trattati con SF per 6 - 48 ore, e successivamente esposti a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100  $\mu$ M per 30 minuti. Nelle cellule non trattate con SF l'esposizione a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ha determinato una riduzione significativa della vitalità cellulare di circa il 60 %. Il trattamento con SF per 12 e 24 ore ha incrementato in modo significativo la vitalità cellulare rispetto alle cellule esposte ad H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mentre la vitalità è rimasta significativamente minore rispetto a quella misurata nelle cellule controllo. Al contrario, il trattamento con SF per 48 ore è stato in grado di mantenere la vitalità cellulare a valori paragonabili a quelli ottenuti in cellule controllo.

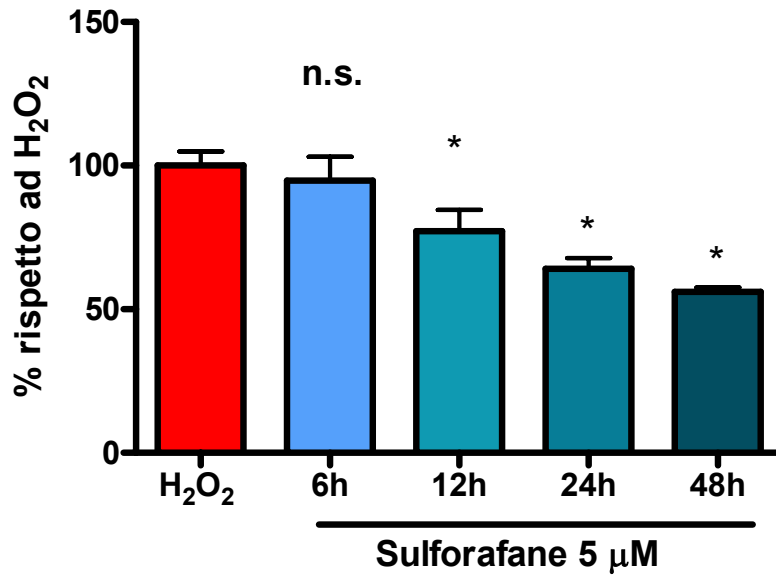


**Figura 7.1** *Vitalità cellulare di cardiomiociti trattati con SF in presenza/assenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le cellule sono state trattate con SF 5  $\mu$ M per 6, 12, 24 e 48 ore. Al termine di ciascun trattamento le cellule sono state esposte ad H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100  $\mu$ M per 30 minuti e la vitalità cellulare valutata con il test del MTT come riportato nel capitolo Materiali e metodi. I dati sono medie  $\pm$  DS di 5 esperimenti differenti. L'analisi statistica è stata eseguita tramite analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Bonferroni come post-test, (\*)  $p < 0.05$  rispetto alle cellule controllo, (§)  $p < 0.05$  rispetto alle cellule trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.*

## **7.2 MECCANISMO ANTIOSSIDANTE INDIRETTO DEL SULFORAFANE**

Poiché è stato ipotizzato che l'effetto citoprotettivo evidenziato da SF dipenda da un incremento della capacità antiossidante cellulare è stata successivamente valutata la capacità di SF di influenzare la produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno tramite il saggio spettrofluorimetrico della DCHF-DA, dopo trattamento dei cardiomiociti per tempi differenti con SF.

In figura 7.2 è riportata la formazione di ROS in colture di cardiomiociti trattate con SF 5  $\mu$ M per 6 - 48 ore ed esposte a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100  $\mu$ M per 30 min. L'intensità di fluorescenza ottenuta nelle cellule non trattate con SF ed esposte a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è stata posta uguale a 100 e gli altri valori calcolati in percentuale rispetto a questa. Il trattamento con SF per 6 ore ha mantenuto i livelli delle ROS a valori paragonabili a quelli osservati in cellule non trattate, confermando che non vi sia interazione diretta tra SF e le specie radicaliche, mentre ai tempi più lunghi di esposizione, SF è stato in grado di ridurre significativamente i livelli delle ROS rispetto alle cellule non trattate.



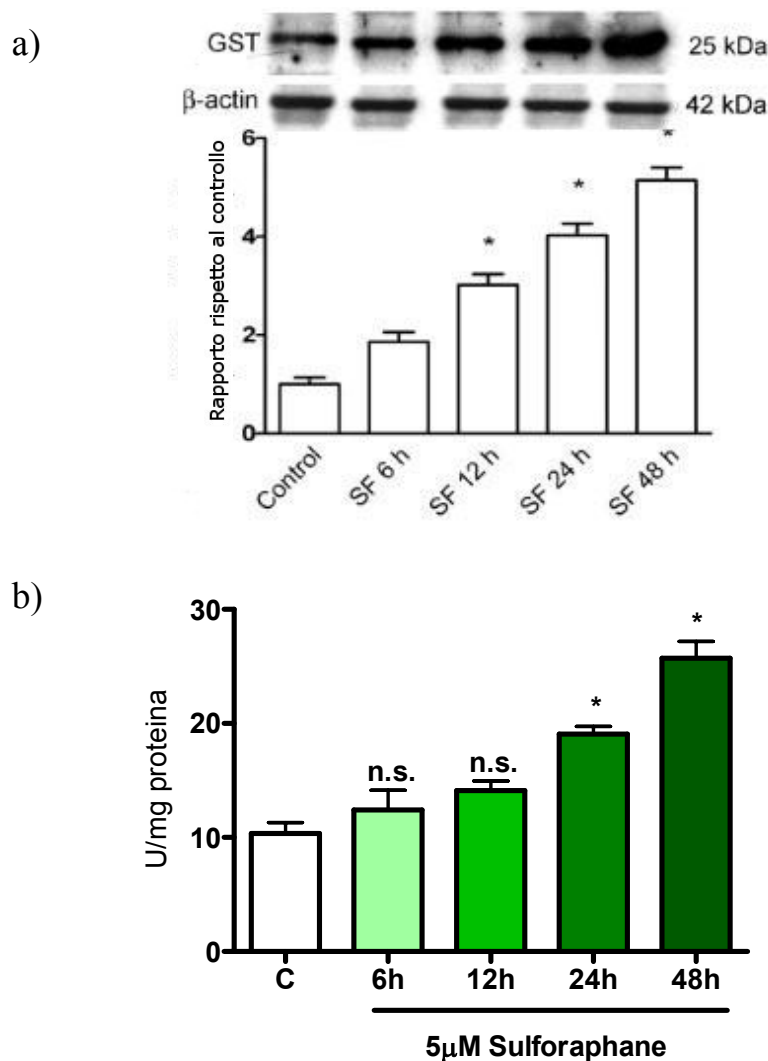
**Figura 7.2: Produzione di ROS in colture di cardiomiociti trattate con SF.** Le cellule sono state trattate con SF 5  $\mu$ M per 6, 12, 24 e 48 ore. Al termine di ciascun trattamento le cellule sono state esposte ad H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10  $\mu$ M per 30 minuti e la produzione intracellulare di ROS è stata valutata utilizzando DCFH-DA come riportato nel capitolo Materiali e metodi. I dati sono medie  $\pm$  DS di 5 esperimenti differenti. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Dunnett come post-test, (\*)  $p < 0.05$ ; n.s.=non significativo rispetto alle cellule controllo.

### **7.3 EFFETTO DEL SULFORAFANE SULL'ESPRESSIONE ED ATTIVITÀ DEGLI ENZIMI DI FASE 2**

Numerosi studi hanno evidenziato la capacità di SF di indurre enzimi detossificanti di fase 2 in diversi modelli cellulari. Poiché, ad oggi non sono stati riportati studi relativi all'effetto di SF in cellule cardiache, primo obiettivo della sperimentazione è stato valutare l'effetto della trattamento con SF (5  $\mu$ M), per tempi differenti (6, 12, 24 e 48 h), sull'espressione ed attività dei principali enzimi detossificanti/antiossidanti di fase 2 (GST, GR, GPx, NQO1, TR, SOD, CAT),

#### ***7.3.1 Glutathione-S-Transferasi***

In figura 7.3 sono riportate l'attività ed i livelli di espressione della GST, valutata tramite analisi immunoblotting, in colture di cardiomiociti trattate con SF 5  $\mu$ M per 6 - 48 ore. Dopo 6 e 12 ore di trattamento con SF, l'attività dell'enzima (fig 7.3b) non è risultata significativamente differente rispetto a quella misurata in cellule controllo. Solo dopo 24 e 48 ore di trattamento si è evidenziato un significativo incremento dell'attività della GST. I risultati dell'analisi immunoblotting (fig 7.3a) seguono lo stesso andamento dell'attività enzimatica, anche se in questo caso è possibile osservare un'induzione della proteina già dopo 6h di trattamento.



**Figura 7.3: Espressione proteica (a) ed attività (b) della GST in colture di cardiomiociti trattate con SF.** Le cellule sono state trattate con SF 5  $\mu$ M per 6, 12, 24 e 48 ore. L'espressione proteica è stata valutata tramite analisi immunoblotting e l'attività dell'enzima per via spettrofotometrica, come riportato nel capitolo Materiali e metodi. La figura (a) è un esempio rappresentativo di 3 esperimenti differenti. L'intensità delle bande è stata espressa come rapporto rispetto all'intensità della banda relativa al controllo. I dati in figura (b) sono medie  $\pm$  DS di 5 esperimenti differenti. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Dunnett, (\*)  $p < 0.05$ ; n.s. = non significativo rispetto alle cellule controllo.

### **7.3.2 *Glutathione Reduttasi***

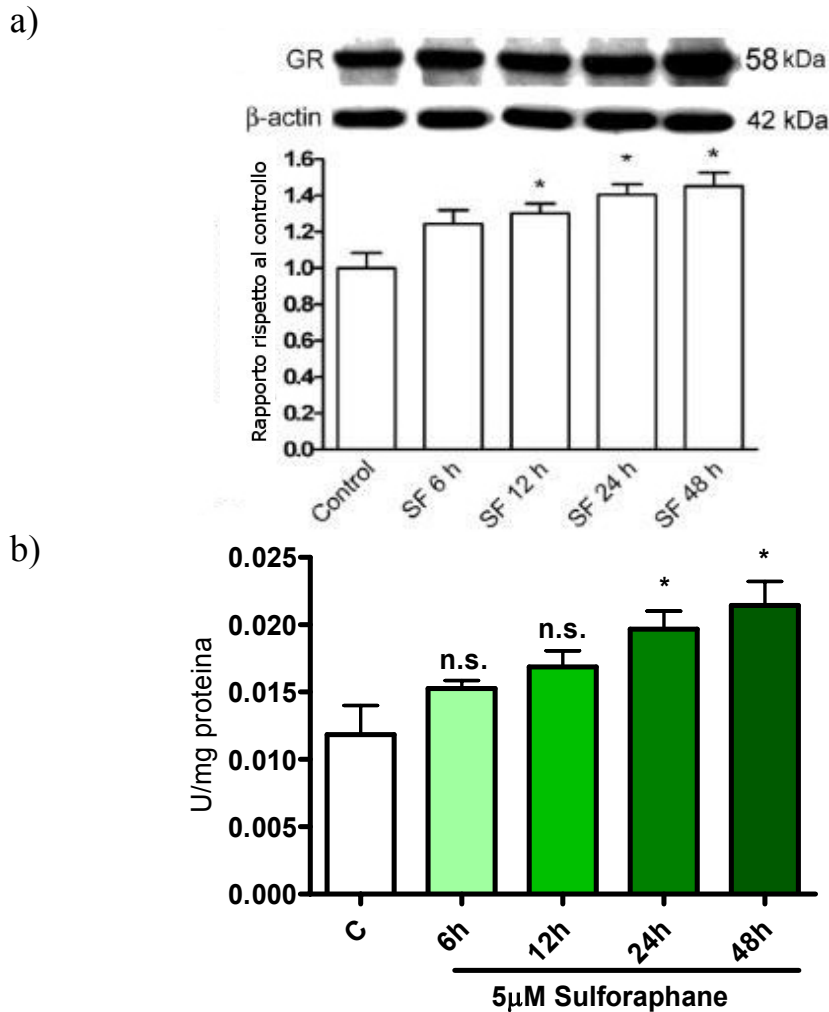
In figura 7.4 sono riportate l'attività ed i livelli di espressione della GR, valutata tramite analisi immunoblotting, in colture di cardiomiociti trattate con SF 5  $\mu$ M per 6 - 48 ore. Dopo 6 e 12 ore di trattamento, l'attività dell'enzima (figura 7.4b) non è risultata significativamente differente rispetto a quella misurata in cellule controllo. Solo dopo 24 e 48 ore di trattamento si è evidenziato un significativo incremento dell'attività della GR. I risultati dell'analisi immunoblotting (figura 7.4a), sono in accordo con i dati dell'attività enzimatica. Anche in questo caso l'induzione è risulta massima dopo 48 h di trattamento.

### **7.3.3 *Glutathione perossidasi***

L'attività enzimatica (figura 7.5b) ed i livelli di espressione dell'enzima (figura 7.5a), valutati tramite analisi immunoblotting, non vengono influenzati dal trattamento con SF a nessuno dei tempi considerati

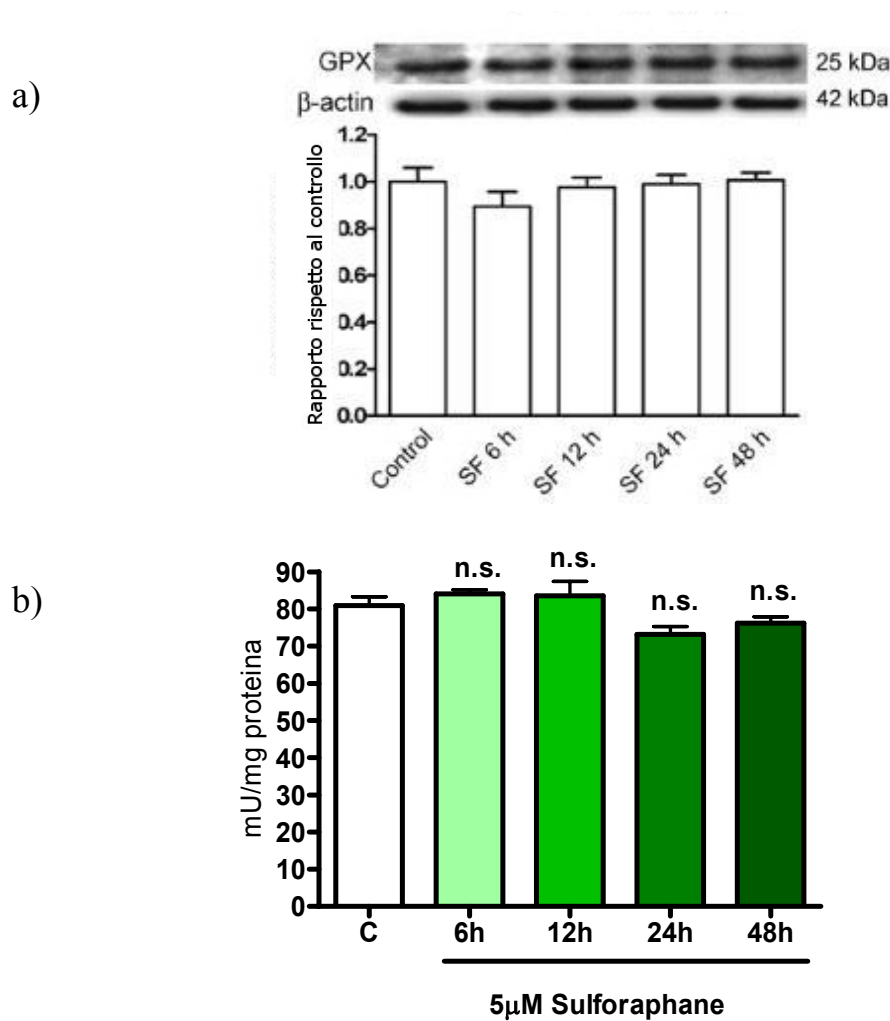
### **7.3.4 *NAD(P)H: chinone ossidoreduttasi 1***

In figura 7.6 sono riportate l'attività ed i livelli di espressione della NQO1, valutati tramite analisi immunoblotting, in colture di cardiomiociti trattate con SF 5  $\mu$ M per 6 - 48 ore. L'attività enzimatica (fig 7.6b) è risultata significativamente incrementata rispetto a quella delle cellule controllo dopo 12 h di trattamento. In particolare, è emersa una correlazione statisticamente significativa ( $r^2=0.9335$ ,  $p<0.0001$ ) tra attività enzimatica e tempo di trattamento. I dati dell'analisi immunoblotting (fig 7.6a) seguono lo stesso andamento dell'attività enzimatica.

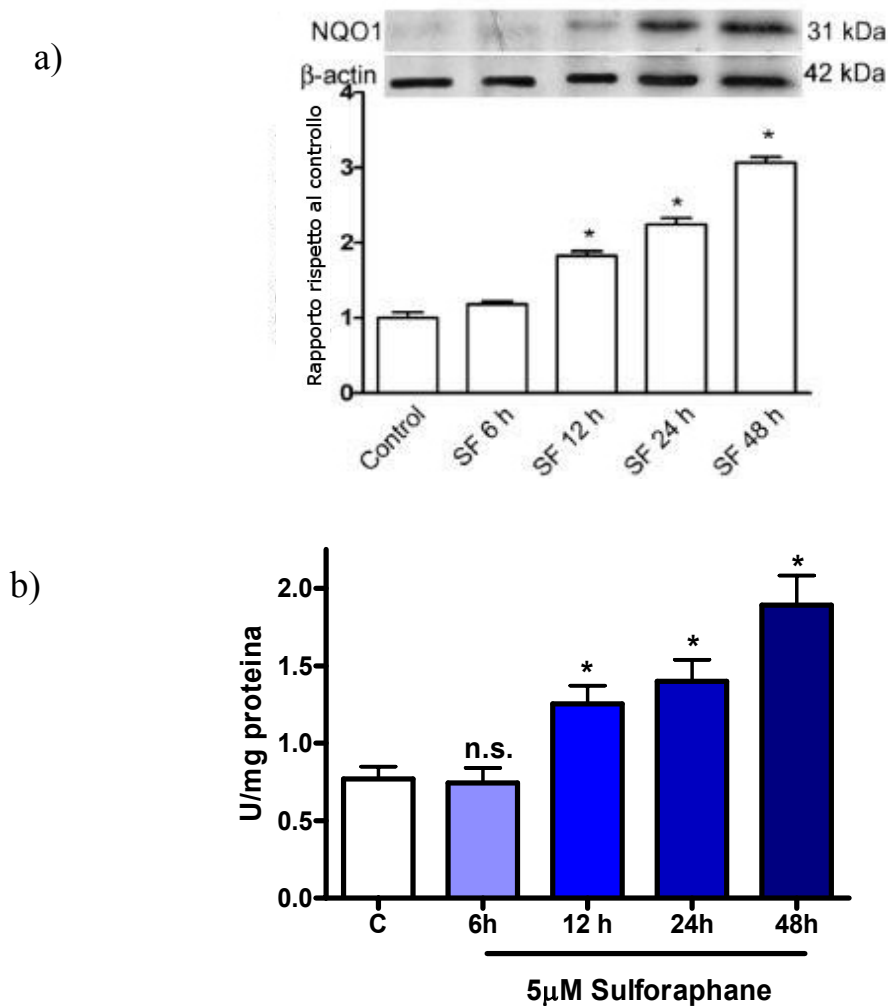


**Figura 7.4: Espressione proteica (a) ed attività (b) della GR in colture di cardiomiociti trattate con SF.** Le cellule sono state trattate con SF 5 μM per 6, 12, 24 e 48 ore. L'espressione proteica è stata valutata tramite analisi immunoblotting e l'attività dell'enzima per via spettrofotometrica, come riportato nel capitolo Materiali e metodi. La figura (a) è un esempio rappresentativo di 3 esperimenti differenti. L'intensità delle bande è stata espressa come rapporto rispetto all'intensità della banda relativa al controllo. I dati in figura (b) sono medie  $\pm$  DS di 5 esperimenti differenti. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Dunnett, (\*)  $p < 0.05$ ; n.s. = non significativo rispetto alle cellule controllo.





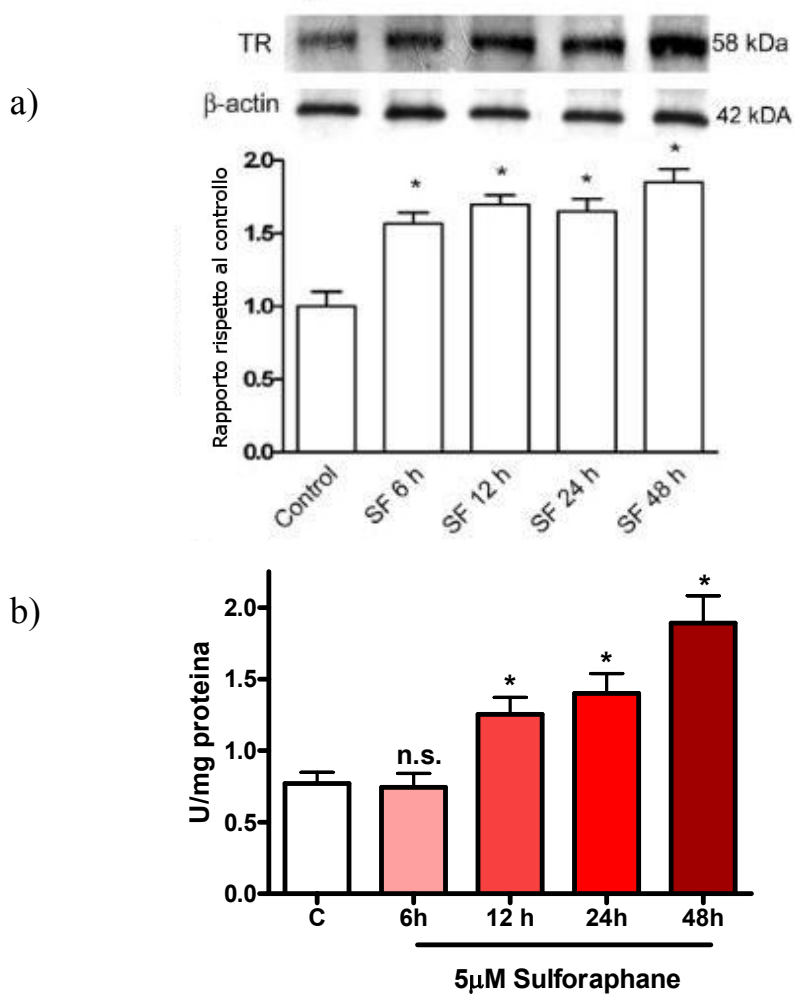
**Figura 7.5: Espressione proteica (a) ed attività (b) della GPx in colture di cardiomiociti trattate con SF.** Le cellule sono state trattate con SF 5  $\mu$ M per 6, 12, 24 e 48 ore. L'espressione proteica è stata valutata tramite analisi immunoblotting e l'attività dell'enzima per via spettrofotometrica, come riportato nel capitolo Materiali e metodi. La figura (a) è un esempio rappresentativo di 3 esperimenti differenti. L'intensità delle bande è stata espressa come rapporto rispetto all'intensità della banda relativa al controllo. I dati in figura (b) sono medie  $\pm$  DS di 5 esperimenti differenti. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Dunnett, n.s. = non significativo rispetto alle cellule controllo.



**Figura 7.6: Espressione proteica (a) ed attività (b) della NQO1 in colture di cardiomiociti trattate con SF.** Le cellule sono state trattate con SF 5  $\mu$ M per 6, 12, 24 e 48 ore. L'espressione proteica è stata valutata tramite analisi immunoblotting e l'attività dell'enzima per via spettrofotometrica, come riportato nel capitolo Materiali e metodi. La figura (a) è un esempio rappresentativo di 3 esperimenti differenti. L'intensità delle bande è stata espressa come rapporto rispetto all'intensità della banda relativa al controllo. I dati in figura (b) sono medie  $\pm$  DS di 5 esperimenti differenti. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Dunnett, (\*)  $p < 0.05$ ; n.s. = non significativo rispetto alle cellule controllo.

### **7.3.5 Tioredoxina reduttasi**

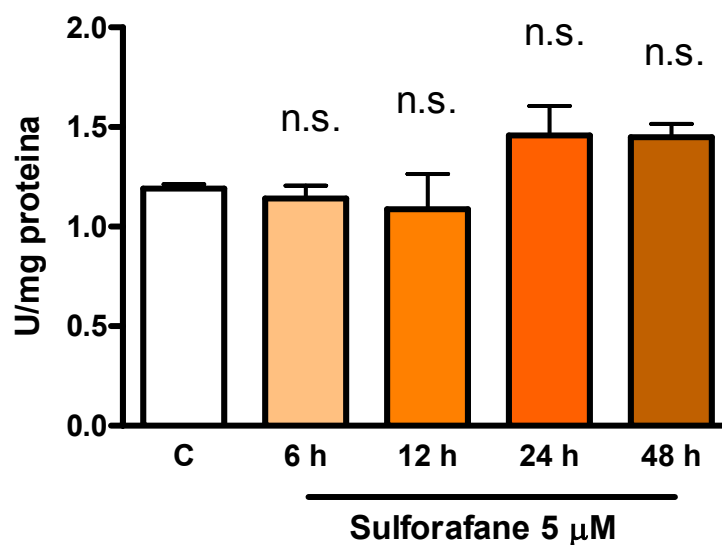
In figura 7.7 sono riportate l'attività, valutata con un saggio spettrofotometrico, ed i livelli di espressione della TR, valutati tramite analisi immunoblotting, in colture di cardiomiociti trattate con SF 5  $\mu$ M per 6 - 48 ore. A partire dalle 12 h di trattamento l'attività dell'enzima (fig 7.7b) è risultata significativamente aumentata rispetto a quella delle cellule controllo. I risultati dell'analisi immunoblotting (fig 7.7a) confermano i dati dell'attività dell'enzima, anche se un incremento dell'espressione della proteina è osservabile anche dopo 6 h di trattamento con SF.



**Figura 7.7: Espressione proteica (a) ed attività (b) della TR in colture di cardiomiociti trattate con SF.** Le cellule sono state trattate con SF 5  $\mu$ M per 6, 12, 24 e 48 ore. L'espressione proteica è stata valutata tramite analisi immunoblotting e l'attività dell'enzima per via spettrofotometrica, come riportato nel capitolo Materiali e metodi. La figura (a) è un esempio rappresentativo di 3 esperimenti differenti. L'intensità delle bande è stata espressa come rapporto rispetto all'intensità della banda relativa al controllo. I dati in figura (b) sono medie  $\pm$  DS di 5 esperimenti differenti. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Dunnett, (\*)  $p < 0.05$ ; n.s. = non significativo rispetto alle cellule controllo.

### 7.3.6 Attività della superossido dismutasi (SOD)

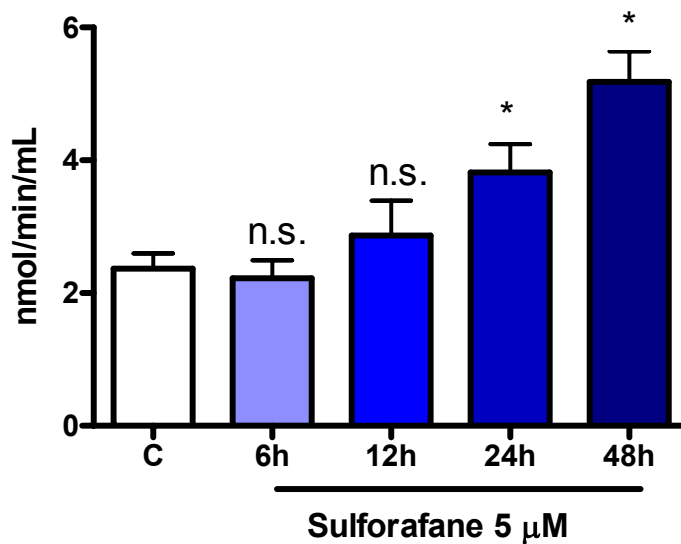
In figura 7.8 è riportata l'attività della SOD in colture di cardiomiociti trattate con SF 5  $\mu$ M per 6 - 48 ore. Dall'analisi statistica non è emersa alcuna differenza significativa tra le cellule trattate con SF per tempi diversi e le cellule controllo.



**Figura 7.8:** Attività della SOD in colture di cardiomiociti trattate con SF. Le cellule sono state trattate con SF 5  $\mu$ M per 6, 12, 24 e 48 ore. L'attività dell'enzima è stata valutata per via spettrofotometrica come riportato nel capitolo Materiali e metodi. I dati riportati in figura sono medie  $\pm$  DS di 5 esperimenti differenti. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Dunnett, n.s. = non significativo rispetto alle cellule controllo.

### 7.3.7 Attività della catalasi (CAT)

In figura 7.9 è riportata l'attività della CAT in colture di cardiomiociti supplementare con SF 5  $\mu$ M per 6 - 48 ore. Dopo 24 e 48 h di trattamento con SF l'attività della SOD è risultata significamene superiore rispetto a quella misurata nelle cellule controllo, mentre il trattamento per tempi più brevi non ha avuto alcuna influenza su questo parametro.

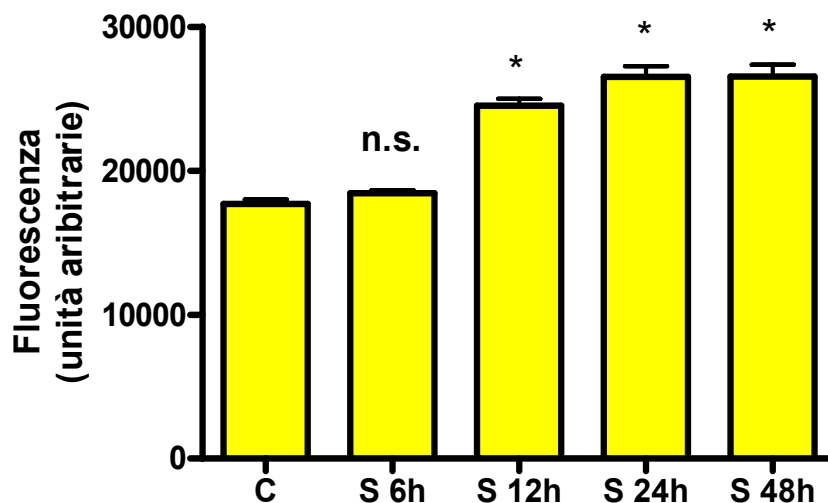


**Figura 7.9:** Attività della CAT in colture di cardiomiociti trattate con SF. Le cellule sono state trattate con SF 5  $\mu$ M per 6, 12, 24 e 48 ore. L'attività dell'enzima è stata valutata per via spettrofotometrica come riportato nel capitolo Materiali e metodi. I dati riportati in figura sono medie  $\pm$  DS di 5 esperimenti differenti. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Dunnett, (\*)  $p < 0.05$ ; n.s. = non significativo rispetto alle cellule controllo.

### 7.3.8 Contenuto intracellulare di Glutathione ridotto (GSH)

In figura 7.10 sono riportati i livelli di GSH intracellulari, misurati utilizzando la sonda fluorescente MCB, in colture di cardiomiociti trattate con SF 5  $\mu$ M per 6 - 48 ore.

In accordo con quanto emerso dall'analisi dei dati relativi alle attività degli enzimi legati al metabolismo del GSH, SF è stato in grado di incrementare i livelli di GSH intracellulare rispetto alle cellule controllo dopo almeno 12 ore di trattamento.



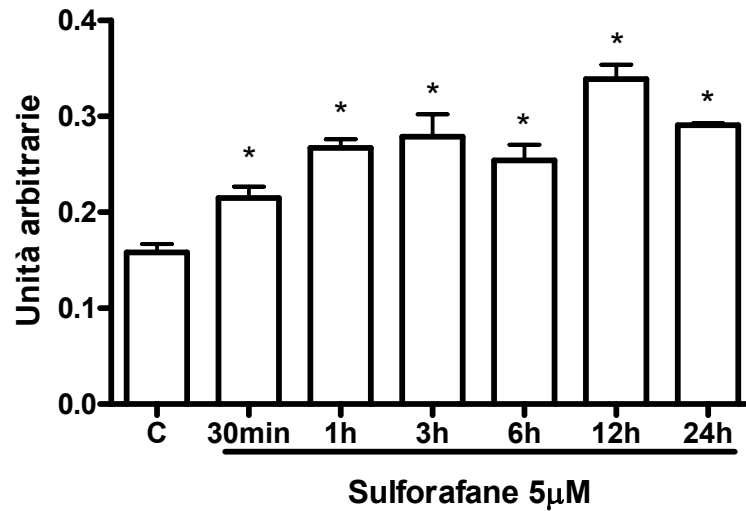
**Figura 7.10: Livelli di GSH intracellulare in colture di cardiomiociti trattate con SF.** Le cellule sono state trattate con SF 5  $\mu$ M per 6, 12, 24 e 48 ore e i livelli di GSH sono stati valutati per via spettrofluorimetrica come riportato nel capitolo Materiali e metodi. I dati sono medie  $\pm$  DS di 5 esperimenti differenti. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA) ad una via seguita dal test di Dunnett, (\*)  $p < 0.05$ ; n.s. = non significativo rispetto alle cellule controllo.

#### **7.4 EFFETTO DEL SULFORAFANE SULLA TRASLOCAZIONE NUCLEARE DI NRF2**

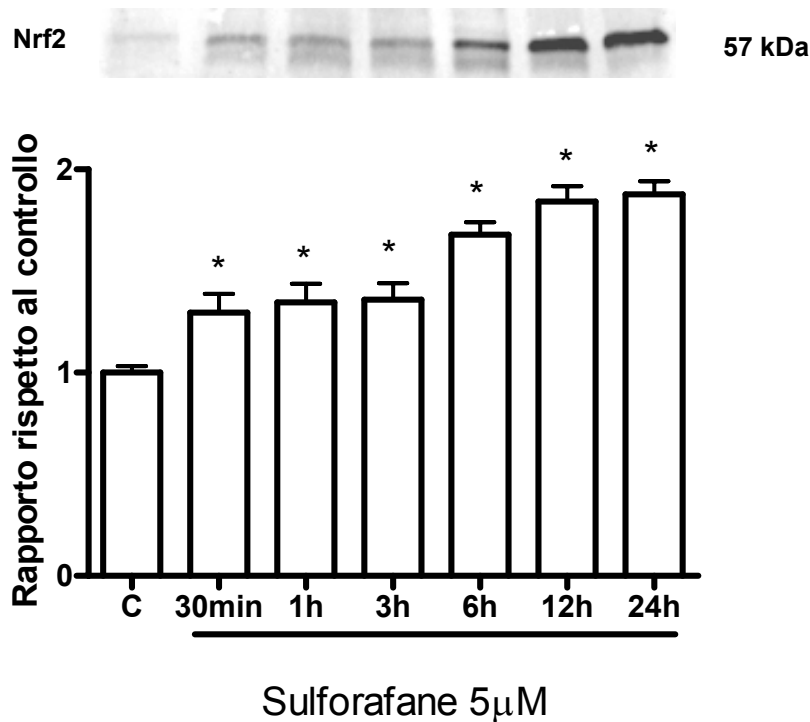
Nrf2 svolge un ruolo chiave nell'induzione dei geni che codificano per enzimi antiossidanti/detossificanti di fase 2 dal SF e tale induzione è il risultato dell'interazione a livello nucleare di Nrf2 con la sequenza enhancer ARE. Volendo individuare e/o validare se l'induzione genica citoprotettiva è regolata da un meccanismo simile anche a livello cardiaco, le colture di cardiomiociti sono state trattate con SF 5  $\mu$ M per tempi differenti e successivamente si è proceduto all'isolamento delle frazioni nucleari e citosoliche. La presenza nella frazione nucleare del fattore di trascrizione Nrf2 è stata analizzata utilizzando un kit Elisa seguendo le indicazioni del produttore (Active Motif) (figura 7.11).

Per confermare il risultato, la frazione nucleare è stata successivamente sottoposta ad analisi immunoblotting utilizzando allo scopo un anticorpo specifico diretto contro la proteina Nrf2 (figura 7.12). Entrambi i test hanno evidenziato come nella frazione nucleare si noti un progressivo accumulo di Nrf2 che risulta significativo rispetto al controllo dopo 30 min di trattamento.





**Figura 7.11:** Accumulo del fattore di trascrizione Nrf2 a livello nucleare in colture di cardiomiociti trattate con SF. Le cellule sono state trattate con SF 5  $\mu$ M per 30', 1, 3, 6, 12 e 24 ore e successivamente si è proceduto alla separazione delle diverse frazioni cellulari; la frazione nucleare è stata analizzata con kit Trans AM Nrf2 come riportato nel capitolo Materiali e metodi. I dati sono medie  $\pm$  DS di 3 esperimenti differenti. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA) ad una via seguita dal test di Dunnett, (\*)  $p < 0.05$  rispetto alle cellule controllo.

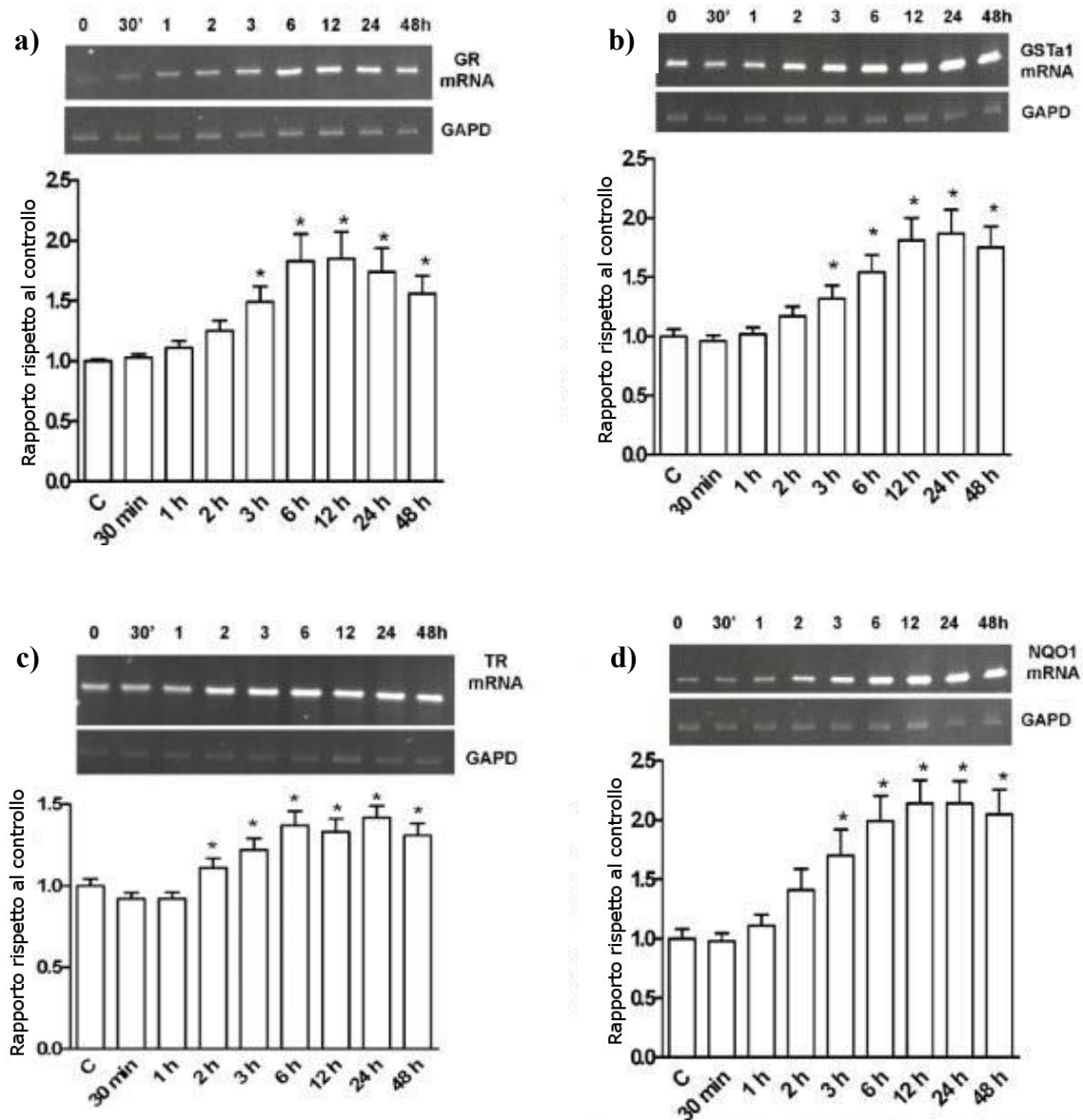


**Figura 7.12:** Accumulo del fattore di trascrizione Nrf2 a livello nucleare in colture di cardiomiociti trattate con SF. Le cellule sono state trattate con SF 5  $\mu$ M per 30', 1, 3, 6, 12 e 24 ore e successivamente si è proceduto alla separazione delle diverse frazioni cellulari; la frazione nucleare è stata sottoposta ad analisi immunoblotting come riportato nel capitolo Materiali e metodi. La figura è un esempio rappresentativo di 3 esperimenti differenti. L'intensità delle bande è stata espressa come rapporto rispetto all'intensità della banda relativa al controllo. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Dunnett, (\*)  $p < 0.05$  rispetto alle cellule controllo.

## **7.5 EFFETTO DEL SULFORAFANE SULL'ESPRESSIONE GENICA DEGLI ENZIMI DETOSSIFICANTI DI FASE 2**

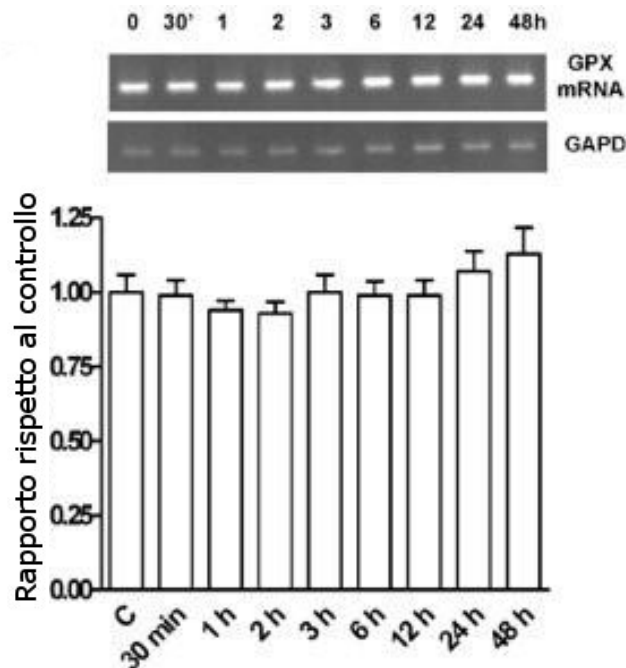
L'accumulo di Nrf2 a livello nucleare in seguito a trattamento con SF è in accordo con quanto osservato riguardo all'influenza di SF sull'espressione genica, valutata tramite analisi RT-PCR, dei livelli di mRNA corrispondenti alla trascrizione dei geni dei principali enzimi di fase 2 cardiaci, GST e GR, NQO1, TR e GPx.

In figura 7.13 sono riportati i livelli di mRNA, ottenuti tramite RT-PCR, dei principali enzimi di fase 2 cardiaci in seguito a supplementazione delle colture con SF 5  $\mu$ M per 30 min - 48 ore. Si può notare un incremento significativo dei livelli di espressione genica, per ognuno dei geni considerati, dopo almeno 3 ore di trattamento con SF e questa up-regolazione si mantiene ai tempi successivi.



**Figura 7.13: Espressione genica di a) GR, b) GST, c) TR, d) NQO1 in colture di cardiomiociti trattate con SF.** Le cellule sono state trattate con SF 5  $\mu$ M per 30 min, 1, 2, 3, 6, 12, 24 e 48 ore. I livelli di mRNA sono stati valutati tramite analisi RT-PCR come riportato nel capitolo Materiali e metodi. Ciascuna figura è un esempio rappresentativo di 3 esperimenti differenti. L'intensità delle bande è stata espressa come rapporto rispetto all'intensità della banda relativa al controllo. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Dunnett, (\*)  $p < 0.05$  rispetto alle cellule controllo.

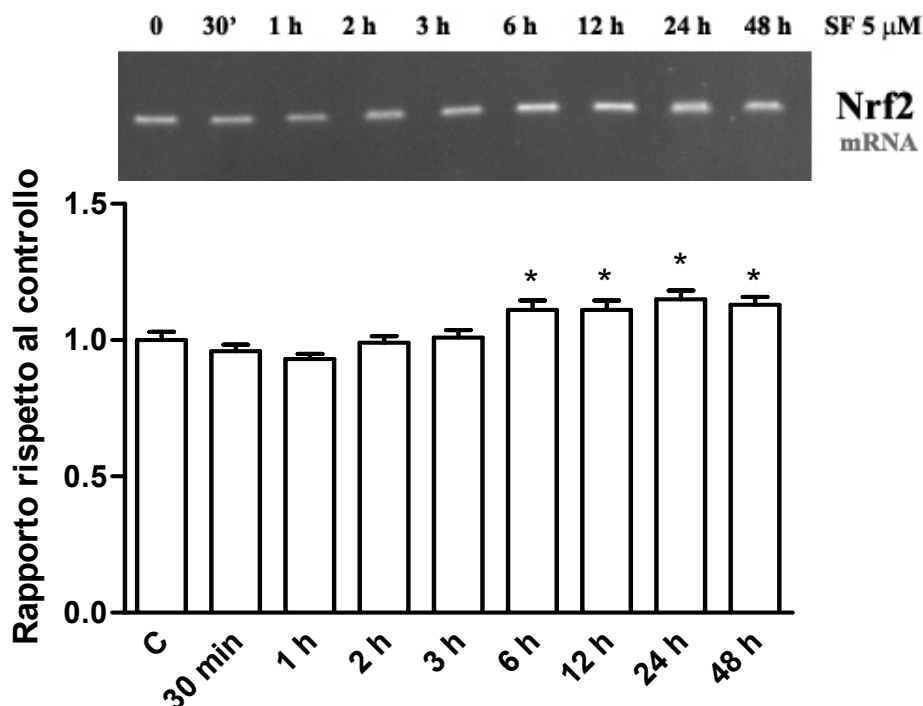
Diversamente da quanto osservato, ma in accordo con i dati precedentemente riportati relativi all'espressione proteica ed all'attività, il trattamento con SF non influenza la trascrizione del gene che codifica per la GPx a nessuno dei tempi considerati (figura 7.14).



**Figura 7.14: Espressione genica di GPx in colture di cardiomiociti trattate con SF.** Le cellule sono state trattate con SF 5  $\mu$ M per 30min, 1, 2, 3, 6, 12, 24 e 48 ore. I livelli di mRNA sono stati valutati tramite analisi RT-PCR come riportato nel capitolo Materiali e metodi. La figura è un esempio rappresentativo di 3 esperimenti differenti. L'intensità delle bande è stata espressa come rapporto rispetto all'intensità della banda relativa al controllo. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Dunnett rispetto alle cellule controllo.

## 7.6 EFFETTO DEL SULFORAFANE SULL'ESPRESSIONE GENICA DI NRF2

Alcuni autori suggeriscono che, congiuntamente all'induzione di enzimi di fase 2, SF sarebbe in grado di indurre anche la trascrizione di Nrf2, cioè il fattore di trascrizione a cui è affidato il controllo della via di segnalazione che porta ad un aumento della capacità antiossidante cellulare. L'analisi RT-PCR ha evidenziato che anche i livelli di mRNA per Nrf2 risultano significativamente superiori rispetto alle cellule controllo dopo 6 h di trattamento (figura 7.15).



**Figura 7.15** Espressione genica di Nrf2 in colture di cardiomiociti trattate con SF. Le cellule sono state trattate con SF 5  $\mu$ M per 30min, 1, 2, 3, 6, 12, 24 e 48 ore. I livelli di mRNA sono stati valutati tramite analisi RT-PCR come riportato nel capitolo Materiali e metodi. La figura è un esempio rappresentativo di 3 esperimenti differenti. L'intensità delle bande è stata espressa come rapporto rispetto all'intensità della banda relativa al controllo. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Dunnett, (\*)  $p < 0.05$  rispetto alle cellule controllo.

### **7.7 EFFETTO DEL SULFORAFANE SU MAPKS E PI3K/AKT.**

Il sistema Nrf2/ARE regola l'induzione di numerosi enzimi antiossidanti e detossificanti, tuttavia la via di trasduzione del segnale che porta ad una attivazione di questa trascrizione ARE mediata non è ancora stata completamente chiarita.

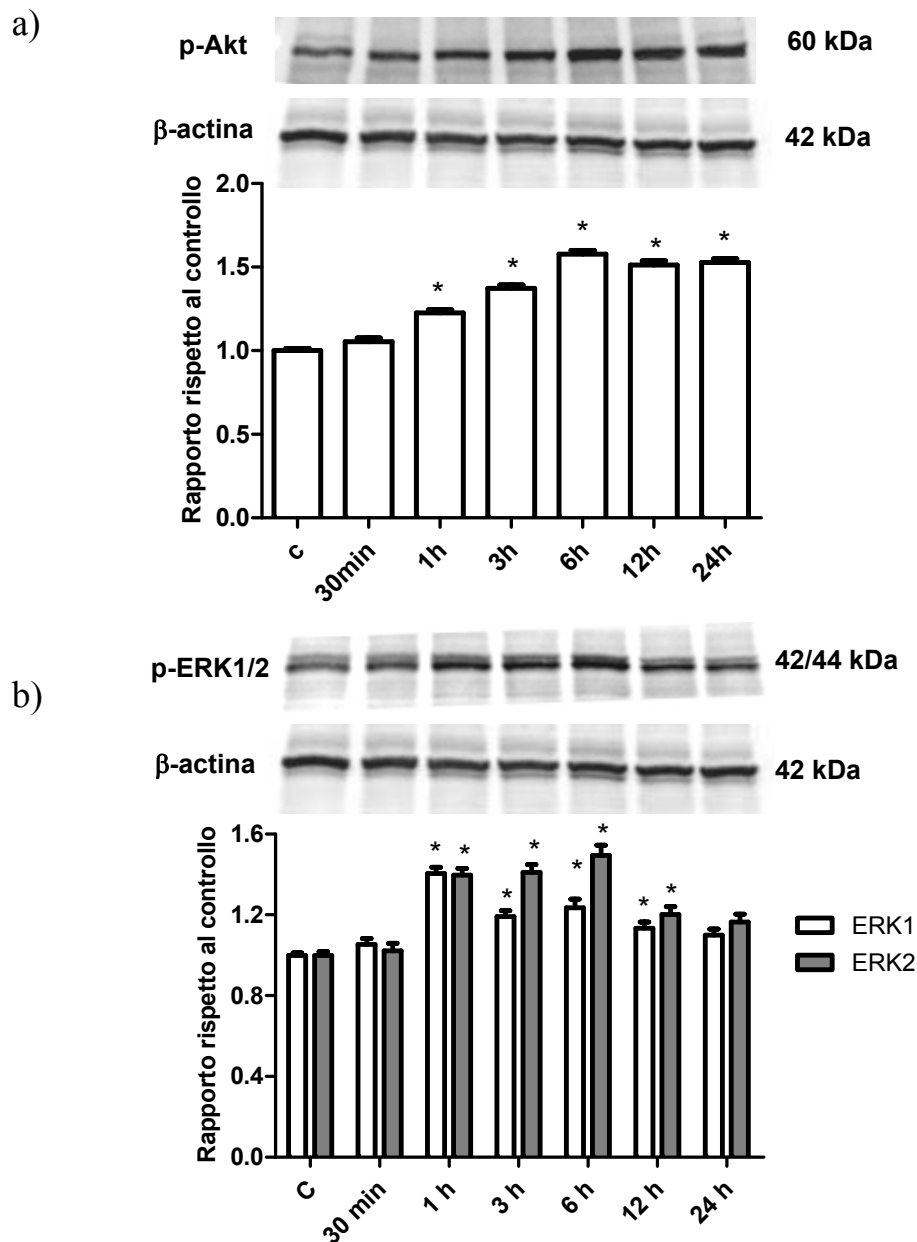
E' stato ipotizzato che il sistema Nrf2-Keap1-ARE possa essere modulato da modificazioni post-traduzionali di Nrf2 o di Keap 1. La fosforilazione determinerebbe un aumento dell'accumulo di Nrf2 a livello nucleare favorendo la dissociazione del complesso Keap1/Nrf2 o stabilizzando il fattore di trascrizione mediante una riduzione della sua degradazione da parte del proteasoma.

Diverse vie di trasduzione del segnale intracellulare tra cui la fosfatidilinositolo 3- chinasi (PI3K)/Akt, la proteina chinasi C, le proteine chinasi mitogeno-attivate (MAPKs) e la RNA-dependent protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), agirebbero a monte di Nrf2-Keap1-ARE.

MAPK quali ERK, JNK, e p38, potrebbero anche essere coinvolte nell'attivazione di ARE aumentando la stabilità del complesso responsabile dell'inizio della trascrizione (Nrf2-Maf-ARE), aumentando così l'attività trascrizionale di Nrf2 (*Chen et al., 2005*)

Il coinvolgimento delle diverse chinasi e l'effetto stimolatorio o inibitorio sulla traslocazione di Nrf2 risulterebbe dipendente dal tipo di modello cellulare (*Keum et al., 2004*).

Nel nostro sistema modello il trattamento con SF 5μM per tempi differenti (30 min-24 h) ha determinato un aumento della forma fosforilata, quindi attiva, sia della MAP chinasi ERK1/2 che di Akt (figura 7.16), significativo dopo 1 h di trattamento e che si mantiene elevato fino a 24 h per Akt e fino a 12 h per ERK1/2 (in particolare è la isoforma 2 che risulta maggiormente modulata).



**Figura 7.16: Effetto di SF sulla fosforilazione di a) Akt e b) ERK1/2 in cardiomiociti neonatali di ratto.** Le cellule sono state trattate con SF 5  $\mu$ M per 30 min - 24 ore. I lisati totali sono stati sottoposti ad analisi immunoblotting come riportato nel capitolo Materiali e metodi. Le figure sono un esempio rappresentativo di 3 esperimenti differenti. L'intensità delle bande è stata espressa come rapporto rispetto all'intensità della banda relativa al controllo. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Dunnett, (\*)  $p < 0.05$  rispetto alle cellule controllo.

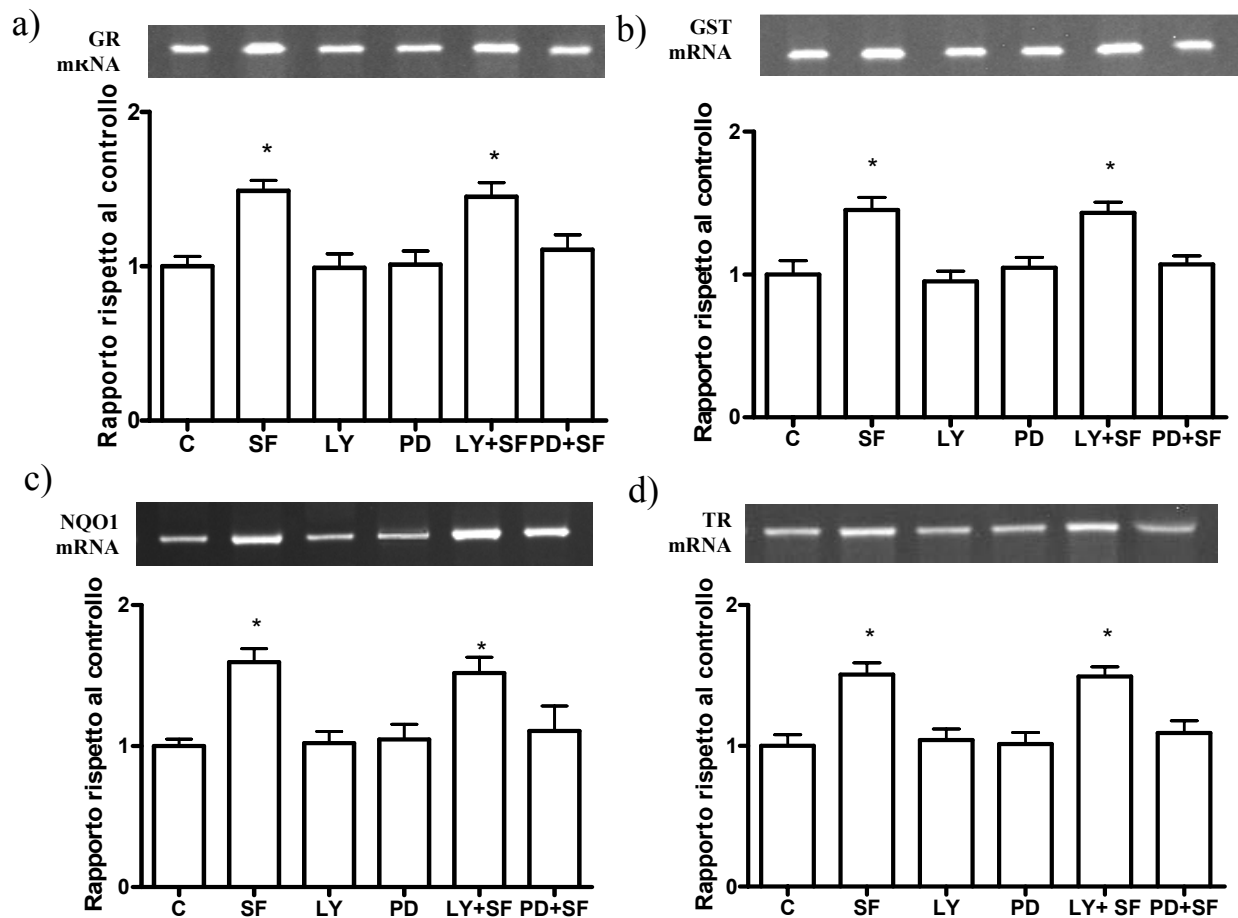


## **7.8 COINVOLGIMENTO DELLE VIE DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE MAPKS E PI3K/AKT NELLA MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA MEDIATA DA SF**

Per valutare il coinvolgimento di ERK 1/2 e PI3K/Akt nella modulazione dell'espressione genica dei principali enzimi di fase 2 operata da SF, le cellule sono state trattate con inibitori specifici di queste due vie di trasduzione. LY294002 è un inibitore specifico della fosforilazione di Akt, mentre PD98059, inibisce la fosforilazione di ERK.

Un'ora prima del trattamento con SF, alle cellule sono stati aggiunti i due inibitori entrambi alla concentrazione 20  $\mu$ M e dopo 6 h si è proceduto all'estrazione dell'RNA ed all'analisi dell'espressione genica dei principali enzimi di fase 2 cardiaci.

Come è osservabile in figura 7.17, gli inibitori delle proteine chinasi non hanno effetto sui livelli basali di espressione genica degli enzimi di fase 2. Il trattamento con SF determina, come già osservato, una up-regolazione genica, che non sembra essere influenzata da Akt, in quanto anche in presenza dell'inibitore specifico l'espressione genica non differisce in modo significativo da quello delle cellule supplementate con solo SF. Il pretrattamento con l'inibitore di ERK determina una diminuzione dell'espressione genica che risulta significativamente differente da quello delle cellule controllo non trattate.



**Figura 7.17: Coinvolgimento di ERK1/2 ed Akt nella modulazione genica di a) GR, b) GST, c) NQO1, d) TR in cardiomiociti neonatali di ratto trattati con SF.** Le cellule sono state trattate con LY e PD (20  $\mu$ M) e successivamente trattate con SF 5  $\mu$ M per 6 h. I livelli di mRNA dei principali enzimi di fase 2 sono stati analizzati mediante RT-PCR come riportato nel capitolo Materiali e metodi. Ciascuna figura è un esempio rappresentativo di 3 esperimenti differenti. L'intensità delle bande è stata espressa come rapporto rispetto all'intensità della banda relativa al controllo. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Dunnett, (\*)  $p < 0.05$ .

---

## 8 DISCUSSIONE

---

L'alimentazione "ottimale" o "funzionale" rappresenta un nuovo strumento per la promozione del benessere psico-fisico e la prevenzione delle malattie cronico-degenerative. La conoscenza delle basi biochimiche delle malattie ha indotto a verificare l'ipotesi di poter modulare le funzioni cellulari e potenziare i sistemi di difesa dell'organismo attraverso composti (nutrienti e soprattutto non nutrienti) presenti negli alimenti naturali, scoprendo quindi e valorizzando la componente funzionale di alimenti che normalmente fanno parte della nostra dieta. Studi sperimentali in sistemi modello e trial clinici sono di fondamentale importanza per sostanziare le proprietà salutistiche che ad un alimento vengono attribuite.

Numerosi studi scientifici hanno evidenziato che lo stress ossidativo riveste un ruolo di primaria importanza nello sviluppo di diverse patologie cronico degenerative tra cui malattie cardiovascolari quali danno da ischemia e riperfusione, aterosclerosi e cardiotoxicità indotta da composti chimici (*Kang, 2003; Molavi et al., 2004*).

In risposta allo stress ossidativo, le cellule cercano di fortificare le proprie difese antiossidanti che rappresentano la prima linea di difesa. Gli enzimi antiossidanti sono coinvolti non solo nella neutralizzazione delle ROS ma anche nell'eliminazione o detossificazione di specie elettrofile (*Chen et al., 2004*). In virtù di questo doppio ruolo gli enzimi antiossidanti non sono inequivocabilmente distinguibili dagli enzimi detossificanti di fase 2. Sebbene gli enzimi antiossidanti e detossificanti siano rapidamente indotti in risposta allo stress ossidativo o elettrofilo, questa risposta adattativa è generalmente transiente e facilmente sopraffatta dall'eccesso di specie reattive prodotte in situazioni patologiche. In questo contesto la fortificazione o il mantenimento dei meccanismi citoprotettivi attraverso

componenti funzionali di alimenti rappresenta oggi una nuova possibile strategia protettiva (*Dinkova-Kostova et al., 2008*).

Gli studi epidemiologici indicano che il consumo di frutta e verdura è associato con un ridotto rischio di malattie cronico-degenerative (*Block et al., 1992*). In particolare, è stata evidenziata una correlazione inversa tra l'assunzione di Crucifereae ed il rischio di molte forme di cancro e questa associazione è risultata essere più stringente rispetto a quella tra il rischio di cancro e l'assunzione di frutta e verdura in generale (*van Poppel et al., 1999*). Dal momento che le Crucifereae, in particolare i vegetali appartenenti al genere Brassica, sono caratterizzate in modo peculiare dal contenuto in GLS, di cui rappresentano la principale fonte di assunzione della dieta umana, è a questi fitocomponenti che potrebbero essere associati gli effetti di promozione della salute (*Zhang, 2004*).

Per idrolisi dei glucosinolati (GLS) accumulati nella pianta, ad opera dell'enzima tioglucoside glucoidrolasi (*Gamet-Payraastre et al., 1998*), si formano gli isotiocianati (ITC) che costituiscono i composti dotati di attività biologica.

In particolare il sulforafane (SF), che deriva dal catabolismo del 4-metilsulfonilbutil GLS glucorafanina, presente prevalentemente nei broccoli, è il composto che ha ricevuto la maggiore attenzione in virtù delle sua azione chemiopreventiva, ascrivibile alla capacità di questo composto di agire come induttore chimico (*Fahey et al., 1997*). L'utilizzo di induttori chimici a scopo preventivo o terapeutico nei confronti di altri tipi di patologie in cui, come per la carcinogenesi, lo stress ossidativo svolge un ruolo causale, è giustificato dal fatto che tali composti sono in grado di modulare l'induzione di geni citoprotettivi, modulazione che risulta in un complessivo potenziamento della capacità antiossidante cellulare e che caratterizza questi composti come antiossidanti di tipo indiretto (*Fahey et al., 1999*).

Una tale strategia protettiva affonda le basi in una migliore e più profonda comprensione del ruolo di tali fitocomponenti e dei

meccanismi e vie di trasduzione del segnale che ne mediano l'azione biomodulatoria.

Dal momento che la modulazione del sistema di difesa antiossidante avviene in modo coordinato è stata ipotizzata l'esistenza di un elemento regolatorio comune, successivamente identificato e caratterizzato come Antioxidant Response Element (ARE), una sequenza localizzata nella regione del promotore dei geni che codificano per enzimi detossificanti/antiossidanti di fase 2 (*Wasserman et al., 1997*).

Un passo importante nella caratterizzazione del ruolo funzionale della sequenza ARE è stato rappresentato dalla identificazione del fattore di trascrizione nucleare Nrf2, in grado di legarsi alla sequenza ARE e di regolare l'attivazione della trascrizione (*Itoh et al., 1997; Moi et al., 1994; Zhu et al., 2001*).

Mediante studi di espressione genica e utilizzando la tecnologia microarray è stato possibile disegnare un profilo trascrizionale in cellule intestinali di topi wild type ed Nrf2 knock-out ed identificare i geni che sono sotto il controllo di questo fattore di trascrizione e bersaglio dell'azione di SF (*Thimmulappa et al., 2002*); in uno studio in vivo nel ratto la tecnologia microarray è stata utilizzata per determinare una batteria di geni a livello epatico, che sono modulati da SF (*Hu et al., 2004*).

SF rappresenta un potente induttore degli antiossidanti endogeni e degli enzimi di fase 2 in diversi tipi di cellule e tessuti (*Juge et al., 2007*), ma dal momento che le ricerche si sono concentrate sul ruolo di SF nella chemioprevenzione (*Fimognari et al., 2007*), dove l'induzione degli enzimi citoprotettivi da parte di componenti fitochimici presenti negli alimenti è una strategia riconosciuta ed efficace (*Eggler et al., 2008*), le conoscenze riguardo l'effetto protettivo ed il meccanismo d'azione sotteso, sono ancora piuttosto limitate a livello cardiaco.

Sono ancora pochi gli studi che correlano il consumo di broccoli con la protezione nei confronti di patologie cardiache (*Mukherjee et al., 2008*), tuttavia, dal momento che i broccoli sono una ricca fonte anche

di altri composti ad azione antiossidante, come ad esempio flavonoidi e Selenio, nessuno di questi studi ha dimostrato l'esistenza di una correlazione diretta tra l'assunzione di SF e la cardioprotezione.

I risultati ottenuti in questa tesi supportano la validità dell'induzione degli antiossidanti endogeni e degli enzimi di fase 2 come strategia citoprotettiva contro il danno ossidativo nel miocardio. I dati da noi ottenuti mostrano molto chiaramente che il pretrattamento con dosi micromolari di SF è in grado di proteggere i cardiomiociti dallo stress citotossico indotto dalla  $H_2O_2$  e dall'accumulo intracellulare di ROS.

È interessante notare come SF conferisca una parziale protezione ai cardiomiociti solo dopo 12 ore di trattamento, mentre a 48 ore tale protezione risulti essere totale, dimostrando che SF esercita un effetto protettivo a lungo termine.

I dati ottenuti confermano anche che tale protezione è ottenuta tramite un meccanismo antiossidante di tipo indiretto il che fornisce ragione della sua tempo-dipendenza. La misura della produzione di specie reattive dell'ossigeno a livello intracellulare mostra che dopo 6 h di trattamento con SF non vi sono differenze significative tra cellule stressate e supplementate rivelando che il SF non ha proprietà di scavenger diretto, ma che la diminuzione della produzione di ROS osservata ai tempi successivi è possibilmente mediata dall'induzione di un'ampia serie di enzimi antiossidanti/detossificanti di fase 2.

Il cuore è considerato deficitario di enzimi antiossidanti/detossificanti rispetto ad altri tessuti e per questo più sensibile all'insulto ossidativo (*Di Meo et al., 1996; Odom et al., 1992*) rendendo ancora più valida una simile strategia citoprotettiva.

Il mantenimento del bilancio redox cellulare è controllato da numerosi sistemi antiossidanti e una sua alterazione ha effetti su varie funzioni e vie di trasduzione del segnale. I sistemi tiolo-riducenti ubiquitariamente espressi includono la tioredoxina, la glutaredoxina e il glutatione (*Nordberg et al., 2001; Powis et al., 1995*).

Il glutatione è uno dei più importanti sistemi antiossidanti endogeni non enzimatici. Esiste nella cellula sia in forma ridotta (GSH) sia in

quella ossidata (GSSG). In condizioni redox fisiologiche prevale GSH, mentre in presenza di stress ossidativo GSH diminuisce ed aumenta GSSG. I risultati ottenuti in questo studio mostrano un significativo incremento del contenuto di GSH intracellulare dopo 12 h di trattamento con SF, indicando un chiaro ruolo di SF nel modulare lo stato redox cellulare.

I dati ottenuti mostrano anche che SF esercita un effetto induttivo su alcuni enzimi coinvolti nel metabolismo del glutatione. L'attività di GR, una flavoproteina che converte GSSG in GSH attraverso l'ossidazione del NADPH a NADP<sup>+</sup>, reazione essenziale per la disponibilità di GSH in vivo, viene significativamente incrementata dal trattamento con SF per 24 h. Questo dato indica che almeno nelle prime ore di trattamento l'induzione dei livelli di GSH non è dovuta esclusivamente all'aumentata attività dell'enzima GR, responsabile della riconversione del GSSG a GSH, ma suggerisce il coinvolgimento di altri meccanismi come probabilmente l'induzione della glutammato-cisteina ligasi, enzima che catalizza la tappa limitante nella sintesi di GSH, come peraltro indicato recentemente da McWalter et al., (*McWalter et al.*, 2004). Questi Autori hanno infatti dimostrato che l'assunzione dietetica di semi di broccoli determina un aumento dei livelli di glutammato-cisteina ligasi in topi Nrf2 +/+, mentre in topi Nrf2 -/- non si osserva alcuna variazione dei livelli di questo enzima, dimostrando così che SF non solo agisce favorendo la traslocazione di Nrf2 nel nucleo, ma anche che è alla base dell'incremento dei livelli di GSH intracellulari.

Il GSH è anche un cofattore per la GST, enzima fondamentale per l'azione detossificante nei confronti dei composti xenobiotici con cui la cellula entra in contatto (*Hayes et al.*, 1995). Numerosi studi hanno inoltre riportato che GST svolge un ruolo importante nella protezione cellulare catalizzando la decomposizione degli idroperossidi lipidici (*Xie et al.*, 2001; *Yang et al.*, 2001).

Analogamente a quanto descritto per GR il trattamento con SF ha determinato un significativo incremento dell'attività di GST dopo 24

h, che può sicuramente contribuire ad aumentare la resistenza cellulare allo stress ossidativo.

La tioredoxina (Trx), una proteina caratterizzata da un tiolo reattivo, insieme con TR, è un sistema ossido riduttivo ubiquitario che svolge importanti funzioni come antiossidante e regolatore redox (*Holmgren et al., 1995; Yamawaki et al., 2003*). È stato dimostrato che una sovraespressione di Trx nel miocardio di topo migliora il recupero post-ischemico ventricolare e riduce la dimensione dell'area infartuata (*Turoczi et al., 2003*). Nei cardiomiociti di ratto adulto contrasta l'ipertrofia provocata dalla stimolazione del recettore  $\alpha$ -adrenergico, suggerendo un ruolo protettivo della Trx endogena nel cuore (*Kuster et al., 2005*). I dati ottenuti nel nostro studio indicano un aumento tempo dipendente dell'attività dell'enzima TR a partire da 12 h di trattamento, l'importante azione di SF sull'attività di questo enzima ha quindi la fondamentale funzione di mantenere elevati i livelli intracellulari di Trx ridotta, contribuendo quindi al mantenimento del potenziale redox cellulare.

Anche il forte incremento di attività di NQO1, osservato nei cardiomiociti a seguito del trattamento con SF, può essere coinvolto negli effetti cardioprotettivi nei confronti della citotossicità indotta dalle ROS. La NQO1, oltre ad essere in grado di attivare e disattivare composti esogeni, ha un ruolo nel metabolismo di chinoni endogeni quali l'ubichinone e la vitamina E. In questo contesto NQO1 agisce come enzima antiossidante, grazie alla sua capacità di mantenere i livelli cellulari di ubichinolo e di rigenerare l'idrochinone della vitamina E, due potenti composti antiossidanti non proteici (*Ross et al., 2000; Siegel et al., 2004*).

SF si è dimostrato in grado di up-regolare l'attività dei principali enzimi di fase 2 a livello cardiaco, non solo determinando un incremento dell'attività degli enzimi considerati, ma agendo anche a livello di induzione dell'espressione genica, come dimostrato dall'analisi RT-PCR dei livelli di mRNA corrispondenti. Va sottolineato come per ciascuno degli enzimi considerati l'induzione dell'espressione genica rappresenti un effetto precoce dell'azione di



SF con un aumento dei livelli di trascritto significativi dopo 3 h di trattamento e che si mantiene per tempi lunghi. L'espressione della proteina e parallelamente l'attività enzimatica sono invece eventi tardivi e questo gap temporale è giustificato dal tempo che intercorre tra la trascrizione e la sintesi di una proteina funzionale.

Al contrario, la GPx non è stata influenzata dal trattamento con SF a nessuno dei tempi considerati, né a livello di induzione genica, né di espressione proteica ed attività. Questo è in accordo con quanto riportato da Hu et al., (*Hu et al., 2007*), che hanno recentemente osservato che la GPx non è significativamente influenzata dal trattamento con SF per 24 h. Anche altri Autori hanno raggiunto risultati analoghi; (*Hintze et al., 2003*) hanno dimostrato che l'assunzione dietetica di SF aumenta l'espressione epatica della TR ma non della GPx. Alcuni autori (*Brigelius-Flohe et al., 2006; Campbell et al., 2007*) suggeriscono che una carenza di Selenio nel terreno di coltura potrebbe rappresentare un fattore limitante nella sintesi di GPx, a favore di altre seleno proteine quali il sistema redox Trx-TR.

Una recente pubblicazione (*Zhu et al., 2008*), che ha investigato il ruolo del fattore di trascrizione Nrf2 a livello cardiaco ha ulteriormente confermato che l'induzione di GPx avviene mediante un meccanismo di regolazione differente.

In questo stesso studio è stato dimostrato come in cellule Nrf2 -/- i livelli basali di attività di SOD e CAT siano notevolmente ridotti e che l'induzione di CAT, ma non di SOD, sia mediata dal sistema Nrf2/ARE. Sebbene in letteratura non siano presenti studi che abbiano valutato la capacità di SF di indurre SOD e CAT nel tessuto cardiaco, i dati ottenuti mostrano che l'attività della CAT è fortemente aumentata a partire da 24 ore di trattamento con SF. Come accennato precedentemente, Zhu et al., (*Zhu et al., 2008*) hanno dimostrato che anche l'espressione della CAT è sotto il controllo di Nrf2. Essendo SF in grado di indurre la liberazione di Nrf2 dal legame con Keap1 (*Hong et al., 2005*) appare chiaro come il trattamento con SF possa indurre l'attività della CAT favorendo la traslocazione di Nrf2 al nucleo. Da

questo meccanismo, almeno a livello cardiaco, sarebbe invece indipendente la SOD per cui lo stesso trattamento con SF non è stato in grado di stimolare significativamente l'attività.

Il fattore di trascrizione nucleare Nrf2 è comunemente coinvolto nella regolazione trascrizionale dei geni che codificano per enzimi citoprotettivi/antiossidanti in condizioni di stress ossidativo (*Itoh et al., 1999a; Kobayashi et al., 2004*). E' importante sottolineare che l'induzione di questi geni, in seguito a a trattamento con SF, dipende da Nrf2 come rivelato da studi condotti in topi Nrf2 knock out. Il profilo trascrizionale delle cellule intestinali derivate da topi wild type (*Nrf2<sup>+/+</sup>*) e knock out (*Nrf2<sup>-/-</sup>*) che avevano ricevuto 9 µmol/die SFN hanno mostrato una up regolazione dei geni detossificanti NQO-1, GST, γ-GCS, e UDP-glucuronosiltransferasi (UGT), insieme a geni che codificano per proteine antiossidanti quali GPx, GR, ferritina e aptoglobina. In topi knock out questa up regolazione risultava compromessa (*Thimmulappa et al., 2002*). Risultati simili sono stati osservati in altri tessuti. Nel fegato risultano indotte γ-GCS e le due subunità di GST-α in seguito a somministrazione di 90 mg SF/kg peso corporeo. Sono stati identificati diversi altri geni dipendenti da Nrf2 tra cui proteine antiossidanti, del sistema ubiquitina/proteasoma, fattori che regolano il ciclo e la crescita cellulare e fattori di trascrizione (*Hu et al., 2006*). In uno studio è stato riportato un aumento delle attività di NQO1 e GST a livello di stomaco, intestino e fegato in topi wild type ma non in quelli Nrf2 knockout dopo il consumo di una dieta contenente estratto di semi di broccoli (*McWalter et al., 2004*). Questi studi, oltre a definire la dipendenza di SF da Nrf2 per l'azione sui target molecolari, rivelano l'influenza di SF in tessuti che svolgono un ruolo critico nell'assorbimento e nella detossificazione.

Anche nel nostro sistema modello il trattamento con SF ha determinato un accumulo di Nrf2 a livello nucleare come visibile dall'analisi immunoblotting della frazione nucleare. Questo dato è confermato dal test ELISA che misura la capacità di legame al DNA del fattore di trascrizione Nrf2, simulandone il meccanismo di azione.

I livelli rilevabili di Nrf2 appaiono significativi già dopo 30 minuti di trattamento con SF. Questo dato è consistente con quanto ottenuto dall'analisi di espressione genica, in cui i livelli di mRNA dei principali geni citoprotettivi risultano significativamente più elevati rispetto ai controlli non supplementati dopo 2/3 h di trattamento con SF. I nostri dati mostrano inoltre che tale induzione si mantiene nel tempo, fino a tempi lunghi di trattamento (24-48 h). Tale fenomeno può essere giustificato dal fatto che, come suggerito da alcuni autori (*Kwak et al., 2003; Nguyen et al., 2003b*), il fattore di trascrizione Nrf2 sia in grado di indurre la sua stessa trascrizione innescando un meccanismo di feedback positivo che sostiene l'induzione genica long-lasting.

I principali meccanismi di regolazione proposti riguardano la regolazione diretta della quantità di proteina Nrf2, così come la regolazione indiretta, ovvero mediata da vie di trasduzione del segnale a monte che portano all'attivazione della via Nrf2/ARE. La proteina citoscheletrica Keap1 è stata recentemente identificata come regolatore chiave dell'attività di Nrf2 (*Itoh et al., 1999b*). Keap1 è una proteina contenente residui cisteinici, alcuni dei quali svolgono un ruolo di sensori delle modificazioni dello stato redox cellulare. Inoltre, certe cisteine (C257, C273, C288 e C297) interagiscono con il dominio N-terminale Neh2 di Nrf2 formando un complesso. Gli induttori di fase 2 distruggono il complesso citoplasmatico Keap1/Nrf2 mediante una modificazione dei gruppi tiolici delle cisteine di Keap1, causando il rilascio di Nrf2 e permettendone la traslocazione al nucleo dove attiva la trascrizione dei geni ARE-dipendenti (*Dinkova-Kostova et al., 2002; Hong et al., 2005; Yamamoto et al., 2008*).

Un ruolo importante di Keap1 nella via di trasduzione Nrf2/ARE risiede nelle proprietà regolatorie nella degradazione di Nrf2. Studi recenti indicano che Keap1 è una proteina adattatrice che indirizza Nrf2 per l'ubiquitinazione e la degradazione dipendente dal proteasoma (*Zhang et al., 2003*).

Un altro meccanismo proposto riguarda la fosforilazione di specifici residui di serina e treonina presenti su Nrf2 che faciliterebbero la dissociazione del fattore di trascrizione, favorendone la migrazione e l'accumulo a livello nucleare. In questo meccanismo sarebbero coinvolte delle proteine chinasi che agirebbero a monte.

SF modula l'attivazione delle proteine chinasi MAPK. Da diversi studi è emerso che SF eleva i livelli di mRNA di NQO1 e UGT1A1 e della proteina multidrug transporter protein (MRP) in cellule Caco2 tramite l'attivazione di MEK/ERK (*Jakubikova et al., 2005*), e determina un'attivazione di ERK1/2 in uno studio in vivo nel ratto (*Hu et al., 2004*). Il coinvolgimento di ERK1/2 e JNK nell'induzione ARE mediata di SF è stata osservata anche in cheratinociti di topo (*Manandhar et al., 2007*) e di ERK2 e Raf-1 in cellule hepalc1c/ di epatoma murino. Diversamente da ERK e JNK, la MAP chinasi p38 sembra regolare in modo negativo l'attivazione di Nrf2 (*Keum et al., 2006*) che fosforilerebbe Nrf2 in un sito presumibilmente diverso da quelli fosforilati da altre chinasi. Tuttavia il ruolo della p38 MAP chinasi è ancora controverso.

Recentemente è stato osservato anche un coinvolgimento dell'attivazione della via PI3K/Akt nella regolazione di Nrf2 (*Svehlikova et al., 2004*).

I dati ottenuti in questa tesi dimostrano che il trattamento con SF 5  $\mu$ M determina un aumento dei livelli delle forme fosforilate, quindi attive, sia di AKT sia di ERK1/2. Mediante l'utilizzo di specifici inibitori di queste vie è stato possibile determinare il loro coinvolgimento nella modulazione dell'espressione genica. I risultati ottenuti mostrano che solo la MAP chinasi ERK è coinvolta in questo meccanismo che non sembra invece essere influenzato da Akt. Bisogna tuttavia ricordare che PI3K/Akt è ampiamente coinvolta nella trasduzione di segnali di sopravvivenza e crescita cellulare per cui una sua attivazione, anche se non direttamente coinvolta nella regolazione dell'attività trascrizionale di Nrf2, può essere considerata come un aumento delle difese cellulari. Infatti un aumento della forma fosforilata di Akt è stato osservato, congiuntamente ad aumentati livelli della proteina

antiapoptotica Bcl-2, in cuori di ratto isolati e perfusi dopo che gli animali erano stati nutriti con un estratto di broccoli (*Mukherjee et al., 2008*).

Come descritto nel capitolo Materiali e metodi, le colture di cardiomiociti utilizzate nella nostra ricerca sono state trattate con SF 5 $\mu$ M, concentrazione che può essere paragonata a quella plasmatica che si raggiunge in seguito all'assunzione dietetica di una porzione di broccoli (*McNaughton et al., 2003; Ye et al., 2002*).

I risultati ottenuti dimostrano una specifica efficacia di SF nel proteggere le cellule cardiache sottoposte ad un danno di tipo radicalico tramite l'induzione di una batteria di importanti enzimi cellulari ad azione detossificante rappresentando un approccio integrato ed efficace per la protezione del danno ossidativo cellulare a livello cardiaco.

Per questa ragione, l'identificazione di componenti minori degli alimenti con effetti protettivi sulle cellule cardiache, quali SF, potrebbe essere utile per lo sviluppo di una strategia preventiva specifica per le patologie cardiache.



---

## 9 BIBLIOGRAFIA

---

Al Janobi AA, Mithen RF, Gasper AV, Shaw PN, Middleton RJ, Ortori CA, et al. *Quantitative measurement of sulforaphane, iberin and their mercapturic acid pathway metabolites in human plasma and urine using liquid chromatography-tandem electrospray ionisation mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2006; 844: 223-34.

Anon. Concerning the amendment of ministerial ordinance on Nutrition improvement law Japan: Ministry of Health and Welfare, 1991.

Anon. Food for Specified Health Use. Seoul: Korea Food Industry Association, 1994.

Anon. *Panel Discussion summary*. Nutrition Reviews 1996; 54: 202.

Arai S. *Studies on functional foods in Japan--state of the art*. Biosci Biotechnol Biochem 1996; 60: 9-15.

Argyrou A, Blanchard JS. *Flavoprotein disulfide reductases: advances in chemistry and function*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 2004; 78: 89-142.

Aslund F, Beckwith J. *Bridge over troubled waters: sensing stress by disulfide bond formation*. Cell 1999; 96: 751-3.

Basten GP, Bao Y, Williamson G. *Sulforaphane and its glutathione conjugate but not sulforaphane nitrile induce UDP-glucuronosyl transferase (UGT1A1) and glutathione transferase (GSTA1) in cultured cells*. Carcinogenesis 2002; 23: 1399-404.

Beall HD, Liu Y, Siegel D, Bolton EM, Gibson NW, Ross D. *Role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase (DT-diaphorase) in cytotoxicity and induction of DNA damage by streptonigrin*. Biochem Pharmacol 1996; 51: 645-52.

Bellisle F, Blundell JE, Dye L, Fantino M, Fern E, Fletcher RJ, et al. *Functional food science and behaviour and psychological functions*. Br J Nutr 1998; 80 Suppl 1: S173-93.

Bertini R, Howard OM, Dong HF, Oppenheim JJ, Bizzarri C, Sergi R, et al. *Thioredoxin, a redox enzyme released in infection and inflammation, is a unique chemoattractant for neutrophils, monocytes, and T cells.* J Exp Med 1999; 189: 1783-9.

Block G, Patterson B, Subar A. *Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence.* Nutr Cancer 1992; 18: 1-29.

Bloom DA, Jaiswal AK. *Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression.* J Biol Chem 2003; 278: 44675-82.

Bogaards JJ, Verhagen H, Willems MI, van Poppel G, van Bladeren PJ. *Consumption of Brussels sprouts results in elevated alpha-class glutathione S-transferase levels in human blood plasma.* Carcinogenesis 1994; 15: 1073-5.

Bolli R, Becker L, Gross G, Mentzer R, Jr., Balshaw D, Lathrop DA. *Myocardial protection at a crossroads: the need for translation into clinical therapy.* Circ Res 2004; 95: 125-34.

Bones AM, Rossiter JT. *The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates.* Phytochemistry 2006; 67: 1053-67.

Bonnesen C, Eggleston IM, Hayes JD. *Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines.* Cancer Res 2001; 61: 6120-30.

Brigelius-Flohe R, Banning A. *Part of the series: from dietary antioxidants to regulators in cellular signaling and gene regulation. Sulforaphane and selenium, partners in adaptive response and prevention of cancer.* Free Radic Res 2006; 40: 775-87.

Broadbent TA, Broadbent HS. *1 - 1. The chemistry and pharmacology of indole-3-carbinol (indole-3-methanol) and 3-(methoxymethyl)indole. [Part I].* Curr Med Chem 1998; 5: 337-52.

Brooks JD, Paton VG, Vidanes G. *Potent induction of phase 2 enzymes in human prostate cells by sulforaphane.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2001; 10: 949-54.



Brusewitz G, Cameron BD, Chasseaud LF, Gorler K, Hawkins DR, Koch H, et al. *The metabolism of benzyl isothiocyanate and its cysteine conjugate*. Biochem J 1977; 162: 99-107.

Burmeister WP, Cottaz S, Rollin P, Vasella A, Henrissat B. *High resolution X-ray crystallography shows that ascorbate is a cofactor for myrosinase and substitutes for the function of the catalytic base*. J Biol Chem 2000; 275: 39385-93.

Callaway EC, Zhang Y, Chew W, Chow HH. *Cellular accumulation of dietary anticarcinogenic isothiocyanates is followed by transporter-mediated export as dithiocarbamates*. Cancer Lett 2004; 204: 23-31.

Campbell L, Howie F, Arthur JR, Nicol F, Beckett G. *Selenium and sulforaphane modify the expression of selenoenzymes in the human endothelial cell line EAhy926 and protect cells from oxidative damage*. Nutrition 2007; 23: 138-44.

Cao Z, Zhu H, Zhang L, Zhao X, Zweier JL, Li Y. *Antioxidants and phase 2 enzymes in cardiomyocytes: Chemical inducibility and chemoprotection against oxidant and simulated ischemia-reperfusion injury*. Exp Biol Med (Maywood) 2006; 231: 1353-64.

Chaudiere J, Ferrari-Iliou R. *Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms*. Food Chem Toxicol 1999; 37: 949-62.

Chen C, Kong AN. *Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling*. Free Radic Biol Med 2004; 36: 1505-16.

Chen C, Kong AN. *Dietary cancer-chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects*. Trends Pharmacol Sci 2005; 26: 318-26.

Ciska E, Martyniak-Przybyszewska B, Kozłowska H. *Content of glucosinolates in cruciferous vegetables grown at the same site for two years under different climatic conditions*. J Agric Food Chem 2000; 48: 2862-7.

Conaway CC, Getahun SM, Liebes LL, Pusateri DJ, Topham DK, Botero-Omary M, et al. *Disposition of glucosinolates and sulforaphane in humans after ingestion of steamed and fresh broccoli*. Nutr Cancer 2000; 38: 168-78.

Conaway CC, Jiao D, Kohri T, Liebes L, Chung FL. *Disposition and pharmacokinetics of phenethyl isothiocyanate and 6-phenylhexyl isothiocyanate in F344 rats*. Drug Metab Dispos 1999; 27: 13-20.

Conaway CC, Wang CX, Pittman B, Yang YM, Schwartz JE, Tian D, et al. *Phenethyl isothiocyanate and sulforaphane and their N-acetylcysteine conjugates inhibit malignant progression of lung adenomas induced by tobacco carcinogens in A/J mice*. Cancer Res 2005; 65: 8548-57.

Cooper DA, Webb DR, Peters JC. *Evaluation of the potential for olestra to affect the availability of dietary phytochemicals*. J Nutr 1997; 127: 1699S-1709S.

Cullinan SB, Diehl JA. *PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress*. J Biol Chem 2004; 279: 20108-17.

Dekker M, Verkerk R, WMF J. *Predictive modelling of health aspects in the food production chain: a case study on glucosinolates in cabbage*. Trends Food Sci Technol 2002; 11: 174-181.

Devling TW, Lindsay CD, McLellan LI, McMahon M, Hayes JD. *Utility of siRNA against Keap1 as a strategy to stimulate a cancer chemopreventive phenotype*. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102: 7280-7285A.

Di Meo S, Venditti P, De Leo T. *Tissue protection against oxidative stress*. Experientia 1996; 52: 786-94.

Di Monte D, Ross D, Bellomo G, Eklow L, Orrenius S. *Alterations in intracellular thiol homeostasis during the metabolism of menadione by isolated rat hepatocytes*. Arch Biochem Biophys 1984; 235: 334-42.

Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, et al. *Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants*. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99: 11908-13.

Dinkova-Kostova AT, Massiah MA, Bozak RE, Hicks RJ, Talalay P. *Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups*. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98: 3404-9.

Dinkova-Kostova AT, Talalay P. *Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins*. Mol Nutr Food Res 2008; 52 Suppl 1: S128-38.

Diplock AT, Aggott PJ, Ashwell M, Bornet F, Fern EBa, Robertfroid MB. *Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document*. British Journal of Nutrition 1999; 81: 1-27.

Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, et al. *Functional food science and defence against reactive oxidative species*. Br J Nutr 1998; 80 Suppl 1: S77-112.

Edlund C, Elhammer A, Dallner G. *Distribution of newly synthesized DT-diaphorase in rat liver*. Biosci Rep 1982; 2: 861-5.

Eggler AL, Gay KA, Mesecar AD. *Molecular mechanisms of natural products in chemoprevention: induction of cytoprotective enzymes by Nrf2*. Mol Nutr Food Res 2008; 52 Suppl 1: S84-94.

Eggler AL, Liu G, Pezzuto JM, van Breemen RB, Mesecar AD. *Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2*. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102: 10070-5.

Eliasson M, Bostrom M, DePierre JW. *Levels and subcellular distributions of detoxifying enzymes in the ovarian corpus luteum of the pregnant and non-pregnant pig*. Biochem Pharmacol 1999; 58: 1287-92.

Fahey JW, Haristoy X, Dolan PM, Kensler TW, Scholtus I, Stephenson KK, et al. *Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of Helicobacter pylori and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99: 7610-5.

Fahey JW, Talalay P. *Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of Phase II detoxication enzymes*. Food Chem Toxicol 1999; 37: 973-9.

Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P. *The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants*. Phytochemistry 2001; 56: 5-51.

Fahey JW, Zhang Y, Talalay P. *Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens*. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94: 10367-72.

Fimognari C, Hrelia P. *Sulforaphane as a promising molecule for fighting cancer*. Mutat Res 2007; 635: 90-104.

Fridovich I. *Superoxide radical and superoxide dismutases*. Annu Rev Biochem 1995; 64: 97-112.

Friling RS, Bensimon A, Tichauer Y, Daniel V. *Xenobiotic-inducible expression of murine glutathione S-transferase Ya subunit gene is controlled by an electrophile-responsive element*. Proc Natl Acad Sci U S A 1990; 87: 6258-62.

Gallegos A, Gasdaska JR, Taylor CW, Paine-Murrieta GD, Goodman D, Gasdaska PY, et al. *Transfection with human thioredoxin increases cell proliferation and a dominant-negative mutant thioredoxin reverses the transformed phenotype of human breast cancer cells*. Cancer Res 1996; 56: 5765-70.

Gamet-Payraastre L, Li P, Lumeau S, Cassar G, Dupont MA, Chevolleau S, et al. *Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells*. Cancer Res 2000; 60: 1426-33.

Gamet-Payraastre L, Lumeau S, Gasc N, Cassar G, Rollin P, Tulliez J. *Selective cytostatic and cytotoxic effects of glucosinolates hydrolysis products on human colon cancer cells in vitro*. Anticancer Drugs 1998; 9: 141-8.

Gasdaska JR, Berggren M, Powis G. *Cell growth stimulation by the redox protein thioredoxin occurs by a novel helper mechanism*. Cell Growth Differ 1995; 6: 1643-50.

Gaziano JM. *Vitamin E and cardiovascular disease: observational studies*. Ann N Y Acad Sci 2004; 1031: 280-91.

Gerhauser C, You M, Liu J, Moriarty RM, Hawthorne M, Mehta RG, et al. *Cancer chemopreventive potential of sulforamate, a novel analogue of sulforaphane that induces phase 2 drug-metabolizing enzymes*. Cancer Res 1997; 57: 272-8.

Getahun SM, Chung FL. *Conversion of glucosinolates to isothiocyanates in humans after ingestion of cooked watercress*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1999; 8: 447-51.

Giudice A, Montella M. *Activation of the Nrf2-ARE signaling pathway: a promising strategy in cancer prevention*. Bioessays 2006; 28: 169-81.

Giugliano D. *Dietary antioxidants for cardiovascular prevention*. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2000; 10: 38-44.

Gorler K, Krumbiegel G, Mennicke WH, Siehl HU. *The metabolism of benzyl isothiocyanate and its cysteine conjugate in guinea-pigs and rabbits*. Xenobiotica 1982; 12: 535-42.

Gross-Steinmeyer K, Stapleton PL, Liu F, Tracy JH, Bammler TK, Quigley SD, et al. *Phytochemical-induced changes in gene expression of carcinogen-metabolizing enzymes in cultured human primary hepatocytes*. Xenobiotica 2004; 34: 619-32.

Hanlon N, Coldham N, Gielbert A, Kuhnert N, Sauer MJ, King LJ, et al. *Absolute bioavailability and dose-dependent pharmacokinetic behaviour of dietary doses of the chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in rat*. Br J Nutr 2008; 99: 559-64.

Hardy G. *Nutraceuticals and functional foods: introduction and meaning*. Nutrition 2000; 16: 688-9.

Harris ED. *Regulation of antioxidant enzymes*. Faseb J 1992; 6: 2675-83.

Hayashi A, Suzuki H, Itoh K, Yamamoto M, Sugiyama Y. *Transcription factor Nrf2 is required for the constitutive and inducible expression of multidrug resistance-associated protein 1 in mouse embryo fibroblasts*. Biochem Biophys Res Commun 2003; 310: 824-9.

Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. *Glutathione transferases*. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2005; 45: 51-88.

Hayes JD, Pulford DJ. *The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance*. Crit Rev Biochem Mol Biol 1995; 30: 445-600.

Hintze KJ, Keck AS, Finley JW, Jeffery EH. *Induction of hepatic thioredoxin reductase activity by sulforaphane, both in Hepa1c1c7 cells and in male Fisher 344 rats*. J Nutr Biochem 2003; 14: 173-179.

Holmgren A. *Thioredoxin*. Annu Rev Biochem 1985; 54: 237-71.

Holmgren A, Bjornstedt M. *Thioredoxin and thioredoxin reductase*. Methods Enzymol 1995; 252: 199-208.

Holst B, Williamson G. *A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds*. Nat Prod Rep 2004; 21: 425-47.

Hong F, Freeman ML, Liebler DC. *Identification of sensor cysteines in human Keap1 modified by the cancer chemopreventive agent sulforaphane*. Chem Res Toxicol 2005; 18: 1917-26.

Hu R, Hebbar V, Kim BR, Chen C, Winnik B, Buckley B, et al. *In vivo pharmacokinetics and regulation of gene expression profiles by isothiocyanate sulforaphane in the rat*. J Pharmacol Exp Ther 2004; 310: 263-71.

Hu R, Xu C, Shen G, Jain MR, Khor TO, Gopalkrishnan A, et al. *Gene expression profiles induced by cancer chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in the liver of C57BL/6J mice and C57BL/6J/Nrf2 (-/-) mice*. Cancer Lett 2006; 243: 170-92.

Hu Y, Urig S, Koncarevic S, Wu X, Fischer M, Rahlfs S, et al. *Glutathione- and thioredoxin-related enzymes are modulated by sulfur-containing chemopreventive agents*. Biol Chem 2007; 388: 1069-81.

Huang H, Starodub O, McIntosh A, Kier AB, Schroeder F. *Liver fatty acid-binding protein targets fatty acids to the nucleus. Real time confocal and multiphoton fluorescence imaging in living cells*. J Biol Chem 2002a; 277: 29139-51.

Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. *Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2*. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97: 12475-80.

Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. *Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription*. J Biol Chem 2002b; 277: 42769-74.

Hue S, & Kim M. *The moderns' health and health supplement foods*. Seoul: Hongikja, 1997.

IARC. *IARC(International Agency for Research on Cancer) Handbook of cancer prevention*. Vol 9. IARC Press Lyon, 2004.

Igarashi K, Kataoka K, Itoh K, Hayashi N, Nishizawa M, Yamamoto M. *Regulation of transcription by dimerization of erythroid factor NF-E2 p45 with small Maf proteins*. Nature 1994; 367: 568-72.

Inamdar NM, Ahn YI, Alam J. *The heme-responsive element of the mouse heme oxygenase-1 gene is an extended AP-1 binding site that resembles the recognition sequences for MAF and NF-E2*

*transcription factors*. Biochem Biophys Res Commun 1996; 221: 570-6.

Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, et al. *An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements*. Biochem Biophys Res Commun 1997; 236: 313-22.

Itoh K, Ishii T, Wakabayashi N, Yamamoto M. *Regulatory mechanisms of cellular response to oxidative stress*. Free Radic Res 1999a; 31: 319-24.

Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, et al. *Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain*. Genes Dev 1999b; 13: 76-86.

Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, O'Connor T, Yamamoto M. *Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles*. Genes Cells 2003; 8: 379-91.

Jakubikova J, Sedlak J, Bod'o J, Bao Y. *Effect of isothiocyanates on nuclear accumulation of NF-kappaB, Nrf2, and thioredoxin in caco-2 cells*. J Agric Food Chem 2006; 54: 1656-62.

Jakubikova J, Sedlak J, Mithen R, Bao Y. *Role of PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways in sulforaphane- and erucin-induced phase II enzymes and MRP2 transcription, G2/M arrest and cell death in Caco-2 cells*. Biochem Pharmacol 2005; 69: 1543-52.

James WP. *Healthy nutrition. Preventing nutrition-related diseases in Europe*. WHO Reg Publ Eur Ser 1988; 24: 1-150.

Jeong WS, Jun M, Kong AN. *Nrf2: a potential molecular target for cancer chemoprevention by natural compounds*. Antioxid Redox Signal 2006; 8: 99-106.

Jiang ZQ, Chen C, Yang B, Hebbar V, Kong AN. *Differential responses from seven mammalian cell lines to the treatments of detoxifying enzyme inducers*. Life Sci 2003; 72: 2243-53.

Johnson F, Giulivi C. *Superoxide dismutases and their impact upon human health*. Mol Aspects Med 2005; 26: 340-52.

Juge N, Mithen RF, Traka M. *Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review*. Cell Mol Life Sci 2007; 64: 1105-27.

Kang KW, Cho IJ, Lee CH, Kim SG. *Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase-dependent CCAAT/enhancer binding protein beta activation in the induction of glutathione S-transferase by oltipraz*. J Natl Cancer Inst 2003; 95: 53-66.

Kang KW, Lee SJ, Park JW, Kim SG. *Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress*. Mol Pharmacol 2002; 62: 1001-10.

Kang MI, Kobayashi A, Wakabayashi N, Kim SG, Yamamoto M. *Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes*. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 2046-51.

Kang YJ. *New understanding in cardiotoxicity*. Curr Opin Drug Discov Devel 2003; 6: 110-6.

Kang YJ. *Antioxidant defense against anthracycline cardiotoxicity by metallothionein*. Cardiovasc Toxicol 2007; 7: 95-100.

Keck AS, Staack R, Jeffery EH. *The cruciferous nitrile crambene has bioactivity similar to sulforaphane when administered to Fischer 344 rats but is far less potent in cell culture*. Nutr Cancer 2002; 42: 233-40.

Keum YS, Jeong WS, Kong AN. *Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms*. Mutat Res 2004; 555: 191-202.

Keum YS, Owuor ED, Kim BR, Hu R, Kong AN. *Involvement of Nrf2 and JNK1 in the activation of antioxidant responsive element (ARE) by chemopreventive agent phenethyl isothiocyanate (PEITC)*. Pharm Res 2003; 20: 1351-6.

Keum YS, Yu S, Chang PP, Yuan X, Kim JH, Xu C, et al. *Mechanism of action of sulforaphane: inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms contributing to the induction of antioxidant response element-mediated heme oxygenase-1 in human hepatoma HepG2 cells*. Cancer Res 2006; 66: 8804-13.



Kirkman HN, Galiano S, Gaetani GF. *The function of catalase-bound NADPH*. J Biol Chem 1987; 262: 660-6.

Kobayashi A, Ohta T, Yamamoto M. *Unique function of the Nrf2-Keap1 pathway in the inducible expression of antioxidant and detoxifying enzymes*. Methods Enzymol 2004; 378: 273-86.

Kohar I, Baca M, Suarna C, Stocker R, Southwell-Keely PT. *Is alpha-tocopherol a reservoir for alpha-tocopheryl hydroquinone?* Free Radic Biol Med 1995; 19: 197-207.

Kojima K. *The Eastern consumer viewpoint: the experience in Japan*. Nutr Rev 1996; 54: S186-8.

Kong AN, Owuor E, Yu R, Hebbar V, Chen C, Hu R, et al. *Induction of xenobiotic enzymes by the MAP kinase pathway and the antioxidant or electrophile response element (ARE/EpRE)*. Drug Metab Rev 2001; 33: 255-71.

Krul C, Humblot C, Philippe C, Vermeulen M, van Nuenen M, Havenaar R, et al. *Metabolism of sinigrin (2-propenyl glucosinolate) by the human colonic microflora in a dynamic in vitro large-intestinal model*. Carcinogenesis 2002; 23: 1009-16.

Kushad MM, Brown AF, Kurilich AC, Juvik JA, Klein BP, Wallig MA, et al. *Variation of glucosinolates in vegetable crops of Brassica oleracea*. J Agric Food Chem 1999; 47: 1541-8.

Kuster GM, Pimentel DR, Adachi T, Ido Y, Brenner DA, Cohen RA, et al. *Alpha-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes is mediated via thioredoxin-1-sensitive oxidative modification of thiols on Ras*. Circulation 2005; 111: 1192-8.

Kutala VK, Khan M, Angelos MG, Kuppusamy P. *Role of oxygen in postischemic myocardial injury*. Antioxid Redox Signal 2007; 9: 1193-206.

Kwak MK, Egner PA, Dolan PM, Ramos-Gomez M, Groopman JD, Itoh K, et al. *Role of phase 2 enzyme induction in chemoprotection by dithiolethiones*. Mutat Res 2001; 480-481: 305-15.

Kwak MK, Wakabayashi N, Itoh K, Motohashi H, Yamamoto M, Kensler TW. *Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival*. J Biol Chem 2003; 278: 8135-45.

Landi L, Fiorentini D, Galli MC, Segura-Aguilar J, Beyer RE. *DT-Diaphorase maintains the reduced state of ubiquinones in lipid vesicles thereby promoting their antioxidant function*. Free Radic Biol Med 1997; 22: 329-35.

Langouet S, Furge LL, Kerriguy N, Nakamura K, Guillouzo A, Guengerich FP. *Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by 1,2-dithiole-3-thione, oltipraz and its derivatives, and sulforaphane*. Chem Res Toxicol 2000; 13: 245-52.

Lee JS, Surh YJ. *Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention*. Cancer Lett 2005; 224: 171-84.

Lefer DJ, Granger DN. *Oxidative stress and cardiac disease*. Am J Med 2000; 109: 315-23.

Li J, Lee JM, Johnson JA. *Microarray analysis reveals an antioxidant responsive element-driven gene set involved in conferring protection from an oxidative stress-induced apoptosis in IMR-32 cells*. J Biol Chem 2002; 277: 388-94.

Li W, Yu SW, Kong AN. *Nrf2 possesses a redox-sensitive nuclear exporting signal in the Neh5 transactivation domain*. J Biol Chem 2006a; 281: 27251-63.

Li Y, Cao Z, Zhu H. *Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress*. Pharmacol Res 2006b; 53: 6-15.

Li Y, Jaiswal AK. *Regulation of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene. Role of API binding site contained within human antioxidant response element*. J Biol Chem 1992; 267: 15097-104.

Lind C, Hochstein P, Ernster L. *DT-diaphorase as a quinone reductase: a cellular control device against semiquinone and superoxide radical formation*. Arch Biochem Biophys 1982; 216: 178-85.

Long DJ, 2nd, Waikel RL, Wang XJ, Roop DR, Jaiswal AK. *NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 deficiency and increased susceptibility to 7,12-dimethylbenz[a]-anthracene-induced carcinogenesis in mouse skin*. J Natl Cancer Inst 2001; 93: 1166-70.

Lonn E, Bosch J, Yusuf S, Sheridan P, Pogue J, Arnold JM, et al. *Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial*. *Jama* 2005; 293: 1338-47.

Lu SC. *Regulation of hepatic glutathione synthesis*. *Semin Liver Dis* 1998; 18: 331-43.

Maheo K, Antras-Ferry J, Morel F, Langouet S, Guillouzo A. *Modulation of glutathione S-transferase subunits A2, M1, and P1 expression by interleukin-1beta in rat hepatocytes in primary culture*. *J Biol Chem* 1997; 272: 16125-32.

Manandhar S, Cho JM, Kim JA, Kensler TW, Kwak MK. *Induction of Nrf2-regulated genes by 3H-1, 2-dithiole-3-thione through the ERK signaling pathway in murine keratinocytes*. *Eur J Pharmacol* 2007; 577: 17-27.

Matusheski NV, Jeffery EH. *Comparison of the bioactivity of two glucoraphanin hydrolysis products found in broccoli, sulforaphane and sulforaphane nitrile*. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 5743-9.

Matusheski NV, Swarup R, Juvik JA, Mithen R, Bennett M, Jeffery EH. *Epithiospecifier protein from broccoli (Brassica oleracea L. ssp. italica) inhibits formation of the anticancer agent sulforaphane*. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 2069-76.

McCord JM. *Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury*. *N Engl J Med* 1985; 312: 159-63.

McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Chanas SA, Henderson CJ, McLellan LI, et al. *The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes*. *Cancer Res* 2001; 61: 3299-307.

McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. *Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression*. *J Biol Chem* 2003; 278: 21592-600.

McNaughton SA, Marks GC. *Development of a food composition database for the estimation of dietary intakes of glucosinolates, the biologically active constituents of cruciferous vegetables*. *Br J Nutr* 2003; 90: 687-97.

McWalter GK, Higgins LG, McLellan LI, Henderson CJ, Song L, Thornalley PJ, et al. *Transcription factor Nrf2 is essential for induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, glutathione S-transferases, and glutamate cysteine ligase by broccoli seeds and isothiocyanates*. J Nutr 2004; 134: 3499S-3506S.

Mithen R. *Glucosinolates - biochemistry, genetics and biological activity*. Plant Growth Regulat 2001; 34: 91-103.

Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. *Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region*. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91: 9926-30.

Molavi B, Mehta JL. *Oxidative stress in cardiovascular disease: molecular basis of its deleterious effects, its detection, and therapeutic considerations*. Curr Opin Cardiol 2004; 19: 488-93.

Mollet B, Rowland I. *Functional foods: at the frontier between food and pharma*. Curr Opin Biotechnol 2002; 13: 483-5.

Motohashi H, Yamamoto M. *Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism*. Trends Mol Med 2004; 10: 549-57.

Mukherjee S, Gangopadhyay H, Das DK. *Broccoli: a unique vegetable that protects mammalian hearts through the redox cycling of the thioredoxin superfamily*. J Agric Food Chem 2008; 56: 609-17.

Munday R, Munday CM. *Induction of phase II detoxification enzymes in rats by plant-derived isothiocyanates: comparison of allyl isothiocyanate with sulforaphane and related compounds*. J Agric Food Chem 2004; 52: 1867-71.

Nakashima I, Takeda K, Kawamoto Y, Okuno Y, Kato M, Suzuki H. *Redox control of catalytic activities of membrane-associated protein tyrosine kinases*. Arch Biochem Biophys 2005; 434: 3-10.

Nakaso K, Yano H, Fukuhara Y, Takeshima T, Wada-Isoe K, Nakashima K. *PI3K is a key molecule in the Nrf2-mediated regulation of antioxidative proteins by hemin in human neuroblastoma cells*. FEBS Lett 2003; 546: 181-4.

Newman GW, Balcewicz-Sablinska MK, Guarnaccia JR, Remold HG, Silberstein DS. *Opposing regulatory effects of thioredoxin and*

*eosinophil cytotoxicity-enhancing factor on the development of human immunodeficiency virus 1*. J Exp Med 1994; 180: 359-63.

Ney PA, Andrews NC, Jane SM, Safer B, Purucker ME, Weremowicz S, et al. *Purification of the human NF-E2 complex: cDNA cloning of the hematopoietic cell-specific subunit and evidence for an associated partner*. Mol Cell Biol 1993; 13: 5604-12.

Nguyen T, Sherratt PJ, Huang HC, Yang CS, Pickett CB. *Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome*. J Biol Chem 2003a; 278: 4536-41.

Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB. *Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element*. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2003b; 43: 233-60.

Nguyen T, Yang CS, Pickett CB. *The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress*. Free Radic Biol Med 2004; 37: 433-41.

Nordberg J, Arner ES. *Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system*. Free Radic Biol Med 2001; 31: 1287-312.

Odom AL, Hatwig CA, Stanley JS, Benson AM. *Biochemical determinants of Adriamycin toxicity in mouse liver, heart and intestine*. Biochem Pharmacol 1992; 43: 831-6.

Okawa H, Motohashi H, Kobayashi A, Aburatani H, Kensler TW, Yamamoto M. *Hepatocyte-specific deletion of the keap1 gene activates Nrf2 and confers potent resistance against acute drug toxicity*. Biochem Biophys Res Commun 2006; 339: 79-88.

Owuor ED, Kong AN. *Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways*. Biochem Pharmacol 2002; 64: 765-70.

Payen L, Courtois A, Loewert M, Guillouzo A, Fardel O. *Reactive oxygen species-related induction of multidrug resistance-associated protein 2 expression in primary hepatocytes exposed to sulforaphane*. Biochem Biophys Res Commun 2001; 282: 257-63.

Pereira FM, Rosa E, Fahey JW, Stephenson KK, Carvalho R, Aires A. *Influence of temperature and ontogeny on the levels of glucosinolates in broccoli (Brassica oleracea Var. italica) sprouts and their effect on*

*the induction of mammalian phase 2 enzymes.* J Agric Food Chem 2002; 50: 6239-44.

Petri N, Tannergren C, Holst B, Mellon FA, Bao Y, Plumb GW, et al. *Absorption/metabolism of sulforaphane and quercetin, and regulation of phase II enzymes, in human jejunum in vivo.* Drug Metab Dispos 2003; 31: 805-13.

Pickett CBPD, Nguyen T, Nioi P. *The Nrf2-ARE signaling pathway and its activation by oxidative stress.* J Biol Chem 2009.

Pink JJ, Planchon SM, Tagliarino C, Varnes ME, Siegel D, Boothman DA. *NAD(P)H:Quinone oxidoreductase activity is the principal determinant of beta-lapachone cytotoxicity.* J Biol Chem 2000; 275: 5416-24.

Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. *The changing faces of glutathione, a cellular protagonist.* Biochem Pharmacol 2003; 66: 1499-503.

Powis G, Briehl M, Oblong J. *Redox signalling and the control of cell growth and death.* Pharmacol Ther 1995; 68: 149-73.

Prester T, Talalay P. *Electrophile and antioxidant regulation of enzymes that detoxify carcinogens.* Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92: 8965-9.

Prochaska HJ, Santamaria AB. *Direct measurement of NAD(P)H:quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: a screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers.* Anal Biochem 1988; 169: 328-36.

Ramos-Gomez M, Kwak MK, Dolan PM, Itoh K, Yamamoto M, Talalay P, et al. *Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice.* Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98: 3410-5.

Roberfroid MB. *Functional effects of food components and the gastrointestinal system: chicory fructooligosaccharides.* Nutr Rev 1996; 54: 38-42.

Roberfroid MB. *Global view on functional foods: European perspectives.* Br J Nutr 2002; 88 Suppl 2: S133-8.

Rogers LK, Tamura T, Rogers BJ, Welty SE, Hansen TN, Smith CV. *Analyses of glutathione reductase hypomorphic mice indicate a genetic knockout*. Toxicol Sci 2004; 82: 367-73.

Ross D, Kepa JK, Winski SL, Beall HD, Anwar A, Siegel D. *NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms*. Chem Biol Interact 2000; 129: 77-97.

Rubartelli A, Bajetto A, Allavena G, Wollman E, Sitia R. *Secretion of thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway*. J Biol Chem 1992; 267: 24161-4.

Rushmore TH, King RG, Paulson KE, Pickett CB. *Regulation of glutathione S-transferase Ya subunit gene expression: identification of a unique xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by planar aromatic compounds*. Proc Natl Acad Sci U S A 1990; 87: 3826-30.

Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB. *The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity*. J Biol Chem 1991a; 266: 11632-9.

Rushmore TH, Pickett CB. *Xenobiotic responsive elements controlling inducible expression by planar aromatic compounds and phenolic antioxidants*. Methods Enzymol 1991b; 206: 409-20.

Sasaki H, Sato H, Kuriyama-Matsumura K, Sato K, Maebara K, Wang H, et al. *Electrophile response element-mediated induction of the cystine/glutamate exchange transporter gene expression*. J Biol Chem 2002; 277: 44765-71.

Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. *A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species*. J Nutr Biochem 2007; 18: 567-79.

Shapiro TA, Fahey JW, Wade KL, Stephenson KK, Talalay P. *Human metabolism and excretion of cancer chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of cruciferous vegetables*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1998; 7: 1091-100.

Shapiro TA, Fahey JW, Wade KL, Stephenson KK, Talalay P. *Chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts: metabolism and excretion in humans*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2001; 10: 501-8.

Shen G, Hebbar V, Nair S, Xu C, Li W, Lin W, et al. *Regulation of Nrf2 transactivation domain activity. The differential effects of mitogen-activated protein kinase cascades and synergistic stimulatory effect of Raf and CREB-binding protein.* J Biol Chem 2004; 279: 23052-60.

Sheweita SA, Tilmisany AK. *Cancer and phase II drug-metabolizing enzymes.* Curr Drug Metab 2003; 4: 45-58.

Siegel D, Bolton EM, Burr JA, Liebler DC, Ross D. *The reduction of alpha-tocopherolquinone by human NAD(P)H: quinone oxidoreductase: the role of alpha-tocopherolhydroquinone as a cellular antioxidant.* Mol Pharmacol 1997; 52: 300-5.

Siegel D, Gibson NW, Preusch PC, Ross D. *Metabolism of diaziquone by NAD(P)H:(quinone acceptor) oxidoreductase (DT-diaphorase): role in diaziquone-induced DNA damage and cytotoxicity in human colon carcinoma cells.* Cancer Res 1990; 50: 7293-300.

Siegel D, Gustafson DL, Dehn DL, Han JY, Boonchoong P, Berliner LJ, et al. *NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger.* Mol Pharmacol 2004; 65: 1238-47.

Siegel D, Ross D. *Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues.* Free Radic Biol Med 2000; 29: 246-53.

Spector A, Yan GZ, Huang RR, McDermott MJ, Gascoyne PR, Pigiet V. *The effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> upon thioredoxin-enriched lens epithelial cells.* J Biol Chem 1988; 263: 4984-90.

Steinmetz KA, Potter JD. *Vegetables, fruit, and cancer. II. Mechanisms.* Cancer Causes Control 1991; 2: 427-42.

Surh YJ, Kundu JK, Na HK. *Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals.* Planta Med 2008; 74: 1526-39.

Svehlikova V, Wang S, Jakubikova J, Williamson G, Mithen R, Bao Y. *Interactions between sulforaphane and apigenin in the induction of UGT1A1 and GSTA1 in CaCo-2 cells.* Carcinogenesis 2004; 25: 1629-37.

Talalay P. *Mechanisms of induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis.* Adv Enzyme Regul 1989; 28: 237-50.



Talalay P. *Chemoprotection against cancer by induction of phase 2 enzymes*. Biofactors 2000; 12: 5-11.

Talalay P, Benson AM. *Elevation of quinone reductase activity by anticarcinogenic antioxidants*. Adv Enzyme Regul 1982; 20: 287-300.

Talalay P, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD. *Importance of phase 2 gene regulation in protection against electrophile and reactive oxygen toxicity and carcinogenesis*. Adv Enzyme Regul 2003; 43: 121-34.

Talalay P, Fahey JW, Holtzclaw WD, Prester T, Zhang Y. *Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction*. Toxicol Lett 1995; 82-83: 173-9.

Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S. *Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray*. Cancer Res 2002; 62: 5196-203.

Thor H, Smith MT, Hartzell P, Bellomo G, Jewell SA, Orrenius S. *The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. A study of the implications of oxidative stress in intact cells*. J Biol Chem 1982; 257: 12419-25.

Tomimoto H, Akiguchi I, Wakita H, Kimura J, Hori K, Yodoi J. *Astroglial expression of ATL-derived factor, a human thioredoxin homologue, in the gerbil brain after transient global ischemia*. Brain Res 1993; 625: 1-8.

Turoczi T, Chang VW, Engelman RM, Maulik N, Ho YS, Das DK. *Thioredoxin redox signaling in the ischemic heart: an insight with transgenic mice overexpressing Trx1*. J Mol Cell Cardiol 2003; 35: 695-704.

Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohe R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D, et al. *Diversity of glutathione peroxidases*. Methods Enzymol 1995; 252: 38-53.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int J Biochem Cell Biol 2007; 39: 44-84.

Vallejo F, Garcia-Viguera C, Tomas-Barberan FA. *Changes in broccoli (Brassica oleracea L. Var. italica) health-promoting*

compounds with inflorescence development. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 3776-82.

van Poppel G, Verhoeven DT, Verhagen H, Goldbohm RA. *Brassica vegetables and cancer prevention. Epidemiology and mechanisms.* *Adv Exp Med Biol* 1999; 472: 159-68.

Venugopal R, Jaiswal AK. *Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 14960-5.

Verkerk R, Schreiner M, Krumbein A, Ciska E, Holst B, Rowland I, et al. *Glucosinolates in Brassica vegetables: The influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health.* *Mol Nutr Food Res* 2008.

Villamena FA, Zweier JL. *Detection of reactive oxygen and nitrogen species by EPR spin trapping.* *Antioxid Redox Signal* 2004; 6: 619-29.

Wakabayashi N, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Kang MI, Kobayashi A, Yamamoto M, et al. *Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 2040-5.

Wang L, Chen Y, Sternberg P, Cai J. *Essential roles of the PI3 kinase/Akt pathway in regulating Nrf2-dependent antioxidant functions in the RPE.* *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49: 1671-8.

Wasserman WW, Fahl WE. *Functional antioxidant responsive elements.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 5361-6.

Wattanapitayakul SK, Bauer JA. *Oxidative pathways in cardiovascular disease: roles, mechanisms, and therapeutic implications.* *Pharmacol Ther* 2001; 89: 187-206.

Winski SL, Koutalos Y, Bentley DL, Ross D. *Subcellular localization of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in human cancer cells.* *Cancer Res* 2002; 62: 1420-4.

Winski SL, Swann E, Hargreaves RH, Dehn DL, Butler J, Moody CJ, et al. *Relationship between NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) levels in a series of stably transfected cell lines and*

*susceptibility to antitumor quinones*. Biochem Pharmacol 2001; 61: 1509-16.

Wolf CR. *Chemoprevention: increased potential to bear fruit*. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98: 2941-3.

Wood ZA, Schroder E, Robin Harris J, Poole LB. *Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins*. Trends Biochem Sci 2003; 28: 32-40.

Xie C, Lovell MA, Xiong S, Kindy MS, Guo J, Xie J, et al. *Expression of glutathione-S-transferase isozyme in the SY5Y neuroblastoma cell line increases resistance to oxidative stress*. Free Radic Biol Med 2001; 31: 73-81.

Xu C, Huang MT, Shen G, Yuan X, Lin W, Khor TO, et al. *Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced skin tumorigenesis in C57BL/6 mice by sulforaphane is mediated by nuclear factor E2-related factor 2*. Cancer Res 2006; 66: 8293-6.

Yagev S, Heller M, Pinson A. *Changes in cytoplasmic and lysosomal enzyme activities in cultured rat heart cells: the relationship to cell differentiation and cell population in culture*. In Vitro 1984; 20: 893-8.

Yamamoto T, Suzuki T, Kobayashi A, Wakabayashi J, Maher J, Motohashi H, et al. *Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity*. Mol Cell Biol 2008; 28: 2758-70.

Yamawaki H, Haendeler J, Berk BC. *Thioredoxin: a key regulator of cardiovascular homeostasis*. Circ Res 2003; 93: 1029-33.

Yang Y, Cheng JZ, Singhal SS, Saini M, Pandya U, Awasthi S, et al. *Role of glutathione S-transferases in protection against lipid peroxidation. Overexpression of hGSTA2-2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation*. J Biol Chem 2001; 276: 19220-30.

Ye L, Dinkova-Kostova AT, Wade KL, Zhang Y, Shapiro TA, Talalay P. *Quantitative determination of dithiocarbamates in human plasma, serum, erythrocytes and urine: pharmacokinetics of broccoli sprout isothiocyanates in humans*. Clin Chim Acta 2002; 316: 43-53.

Ye L, Zhang Y. *Total intracellular accumulation levels of dietary isothiocyanates determine their activity in elevation of cellular*

*glutathione and induction of Phase 2 detoxification enzymes. Carcinogenesis* 2001; 22: 1987-92.

Yoxall V, Kentish P, Coldham N, Kuhnert N, Sauer MJ, Ioannides C. *Modulation of hepatic cytochromes P450 and phase II enzymes by dietary doses of sulforaphane in rats: Implications for its chemopreventive activity. Int J Cancer* 2005; 117: 356-62.

Yu R, Lei W, Mandlekar S, Weber MJ, Der CJ, Wu J, et al. *Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase II detoxifying enzymes by chemicals. J Biol Chem* 1999; 274: 27545-52.

Yu R, Mandlekar S, Lei W, Fahl WE, Tan TH, Kong AN. *p38 mitogen-activated protein kinase negatively regulates the induction of phase II drug-metabolizing enzymes that detoxify carcinogens. J Biol Chem* 2000; 275: 2322-7.

Zhang DD, Hannink M. *Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. Mol Cell Biol* 2003; 23: 8137-51.

Zhang DD, Lo SC, Cross JV, Templeton DJ, Hannink M. *Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. Mol Cell Biol* 2004; 24: 10941-53.

Zhang DD, Lo SC, Sun Z, Habib GM, Lieberman MW, Hannink M. *Ubiquitination of Keap1, a BTB-Kelch substrate adaptor protein for Cul3, targets Keap1 for degradation by a proteasome-independent pathway. J Biol Chem* 2005; 280: 30091-9.

Zhang Y. *Role of glutathione in the accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates and their glutathione conjugates by murine hepatoma cells. Carcinogenesis* 2000; 21: 1175-82.

Zhang Y. *Molecular mechanism of rapid cellular accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates. Carcinogenesis* 2001; 22: 425-31.

Zhang Y. *Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. Mutat Res* 2004; 555: 173-90.

Zhang Y, Callaway EC. *High cellular accumulation of sulforaphane, a dietary anticarcinogen, is followed by rapid transporter-mediated export as a glutathione conjugate. Biochem J* 2002; 364: 301-7.

Zhang Y, Munday R, Jobson HE, Munday CM, Lister C, Wilson P, et al. *Induction of GST and NQO1 in cultured bladder cells and in the urinary bladders of rats by an extract of broccoli (Brassica oleracea italica) sprouts*. J Agric Food Chem 2006; 54: 9370-6.

Zhang Y, Wade KL, Prestera T, Talalay P. *Quantitative determination of isothiocyanates, dithiocarbamates, carbon disulfide, and related thiocarbonyl compounds by cyclocondensation with 1,2-benzenedithiol*. Anal Biochem 1996; 239: 160-7.

Zhu H, Jia Z, Misra BR, Zhang L, Cao Z, Yamamoto M, et al. *Nuclear factor E2-related factor 2-dependent myocardial cytoprotection against oxidative and electrophilic stress*. Cardiovasc Toxicol 2008; 8: 71-85.

Zhu M, Fahl WE. *Functional characterization of transcription regulators that interact with the electrophile response element*. Biochem Biophys Res Commun 2001; 289: 212-9.

Zipper LM, Mulcahy RT. *Erk activation is required for Nrf2 nuclear localization during pyrrolidine dithiocarbamate induction of glutamate cysteine ligase modulatory gene expression in HepG2 cells*. Toxicol Sci 2003; 73: 124-34.



1. Role of Quercetin and its in vivo metabolites in protecting H9c2 cells against oxidative stress. Angeloni C., Spencer J., **Leoncini E.**, Biagi P.L., Hrelia S. *Biochimie* 2007; 89: 73-82.
2. Sulforaphane in the protection of cardiomyocytes from oxidative stress. Malaguti M., Angeloni C., **Leoncini E.**, Pagnotta E., Biagi P.L., Hrelia S. *Journal of molecular and Cellular Cardiology* 2007; 42 suppl 1; S188.
3. Induction of phase II enzymes by sulforaphane leads to cardioprotection. Angeloni C., **Leoncini E.**, Calonghi N., Pagnotta E., Biagi P.L., Hrelia S. *Diet and Chronic Disease. Proceedings of the Nutrition Society* 2007; 66: 111A.
4. Green tea modulates alpha-1-adrenergic stimulated glucose transport in cultured rat cardiomyocytes. Angeloni C., Maraldi T., Ghelli A., Rugolo M., **Leoncini E.**, Hakim G., Hrelia S. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55: 7553-7558.
5. Role of quercetin in modulating rat cardiomyocyte gene expression profile. Angeloni C., **Leoncini E.**, Malaguti M., Angelini S., Hrelia P., Hrelia S. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2008; 294: H1233-43.
6. A nutraceutical lesson from Brassica vegetables: cardioprotection by sulforaphane. **Leoncini E.**, Angeloni C., Malaguti M., Angelini S., Hrelia P. e. Hrelia S. *It. J. Agron.* 2008; 3: 455 - 456.





1. Role of Quercetin in modulating gene expression profile in cultured rat cardiomyocytes. Angeloni C., **Leoncini E.**, Biagi P.L., Masotti L., Hrelia S. Giornata di studio congiunta SIB/SINU “Aspetti biochimici e nutrizionali dell’interazione geni e nutrienti” Bologna 5 Maggio 2006.
2. A microarray analysis of cultured rat cardiomyocytes supplemented with quercetin. C. Angeloni, **E. Leoncini**, P.L. Biagi, Hrelia S. Third European Nutrigenomics Conference. Oxford, 12-15 September 2006.
3. Cardioprotection by sulforaphane: an example of indirect antioxidant activity. **Leoncini E.**, Angeloni C., Biagi P.L., Hrelia S. 51° Congresso Nazionale Società Italiana di Biochimica (SIB), Riccione 28-30 Settembre 2006.
4. Sulforaphane as a new cardioprotective agent against oxidative damage. **Leoncini E.**, Angeloni C., Biagi P.L., Hrelia S. 2nd Symposium International Nutrition, Oxygen Biology and Medicine, Paris – France 11-13 Aprile 2007.
5. Sulforaphane modulates phase 2 enzyme and Nrf2 expression in cultured rat cardiomyocytes. **Leoncini E.**, Angeloni C., Malaguti M., Calonghi N, Angelini S., Biagi P.L., Hrelia S. 52° Congresso Nazionale Società Italiana di Biochimica (SIB), Riccione 26-28 Settembre 2007.
6. Induction of phase II enzymes by sulforaphane leads to cardioprotection. Angeloni C., **Leoncini E.**, Calonghi N., Pagnotta E., Biagi P.L., Hrelia S. Diet and Chronic Disease.

Summer Meeting of the Nutrition Society. Coleraine, Northern Ireland. 16-19 Luglio 2007.

7. Biomodulazione degli enzimi di fase 2 come strategia cardioprotettiva: l'esempio del sulforafane. **Leoncini E.**, Angeloni C., Malaguti M., Angelini S., Biagi P.L. and Hrelia S. Workshop "Antiossidanti naturali tra informazione e disinformazione:metodi di analisi. Biodisponibilità ed effetti in-vivo". Bertinoro (FC) 23 Novembre 2007.
8. Sulforaphane modulates NRF2/ARE pathway in cardiac cells. **Leoncini E.**, Angeloni C., Malaguti M., Angelini S., Hrelia P. and Hrelia S. 53° Congresso Nazionale Societa' Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare. Riccione, 23-26 settembre 2008.